

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2023-0080448
(43) 공개일자 2023년06월07일

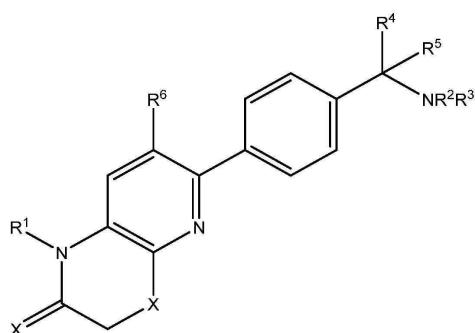
- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 498/04 (2006.01) A61K 31/5383 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01) A61P 9/14 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07D 498/04 (2013.01)
A61K 31/5383 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2023-7014688
(22) 출원일자(국제) 2021년09월29일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2023년04월28일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2021/076811
(87) 국제공개번호 WO 2022/069552
국제공개일자 2022년04월07일
(30) 우선권주장
2015536.2 2020년09월30일 영국(GB)
- (71) 출원인
바데리스 제라퓨틱스 아게
스위스 체하-4056 바젤 리히트슈트라쎄 35 베에스
요트-350 3.05
- (72) 발명자
피카르 다미앙
스위스 4056 바젤 리히트슈트라쎄 35
베에스요트-350 3.05 바데리스 제라퓨틱스 아게
내
생-메자르 피에르
스위스 4056 바젤 리히트슈트라쎄 35
베에스요트-350 3.05 바데리스 제라퓨틱스 아게
내
(74) 대리인
장훈

전체 청구항 수 : 총 47 항

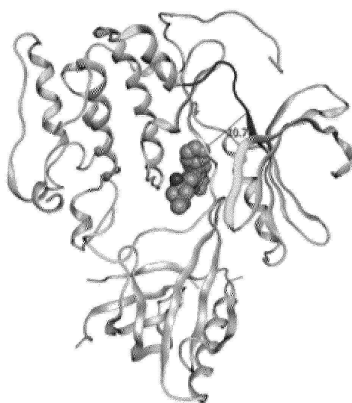
(54) 발명의 명칭 유전성 출혈성 모세혈관확장증의 치료에 사용하기 위한 알로스테릭 AKT 저해제

(57) 요약

본 발명은 유전성 출혈성 모세혈관확장증(HHT)의 치료에 사용하기 위한 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약제학적
으로 허용되는 염을 제공한다.



대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

A61P 9/00 (2018.01)

A61P 9/14 (2018.01)

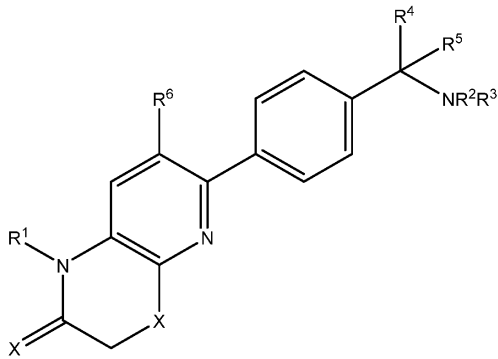
명세서

청구범위

청구항 1

피험자의 유전성 출혈성 모세혈관확장증(HHT)의 치료에 사용하기 위한 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염.

화학식 (I)



여기서,

각각의 X는 독립적으로 O 또는 S이고;

R¹은 수소 및 C₁-C₁₀ 알킬로부터 선택되고, 여기서, 각각의 C₁-C₁₀ 알킬은 할로젠, -CN, -OR⁷ 또는 3 내지 6원 사이클로알킬로부터 선택된 하나 이상의 치환체로 임의로 치환되고;

R² 및 R³은 각각 독립적으로 수소 및 C₁-C₁₀ 알킬로부터 선택되거나; R² 및 R³은, 이들이 부착되어 있는 질소 원자와 함께, 3 내지 6원 헤테로사이클릭 환을 형성하고;

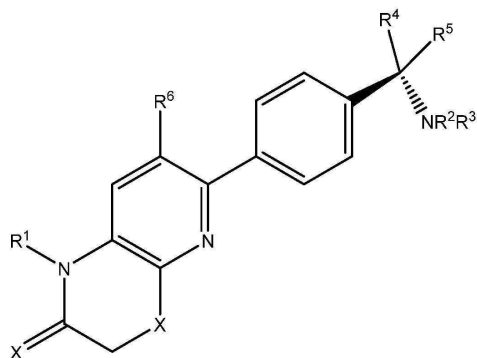
R⁴ 및 R⁵는 각각 독립적으로 C₁-C₆ 알킬, C₂-C₆ 알케닐, 또는 C₂-C₆ 알키닐로부터 선택되거나; R⁴ 및 R⁵는, 이들이 부착되어 있는 탄소 원자와 함께, C₁-C₁₀ 알킬, -CN, -OR⁷, 할로젠, -COR⁷, CO₂R⁷, CONR⁷₂ 및 -NR⁷₂로부터 선택된 하나 이상의 치환체로 임의로 치환된 3 내지 6원 사이클로알킬 또는 헤테로사이클릭 환을 형성하고;

R⁶은 C₁-C₁₀ 알킬, -CN, -OR⁷, 할로젠, -COR⁷, CO₂R⁷, CONR⁷₂ 및 -NR⁷₂로부터 선택된 하나 이상의 치환체로 임의로 치환된 5 내지 7원 아릴 또는 헤테로아릴 환이고;

각각의 R⁷은 독립적으로 수소 및 C₁-C₁₀ 알킬로부터 선택된다.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 화학식 (I)의 화합물은 하기 구조를 갖는, 화합물.



청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, R⁶은 치환되지 않은 페닐인, 화합물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, R⁴ 및 R⁵는, 이들이 부착되어 있는 탄소 원자와 함께, 사이클로부틸 환을 형성하는, 화합물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 X는 O인, 화합물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, R¹은 C₁-C₆ 알킬인, 화합물.

청구항 7

제6항에 있어서, R¹은 메틸 또는 에틸인, 화합물.

청구항 8

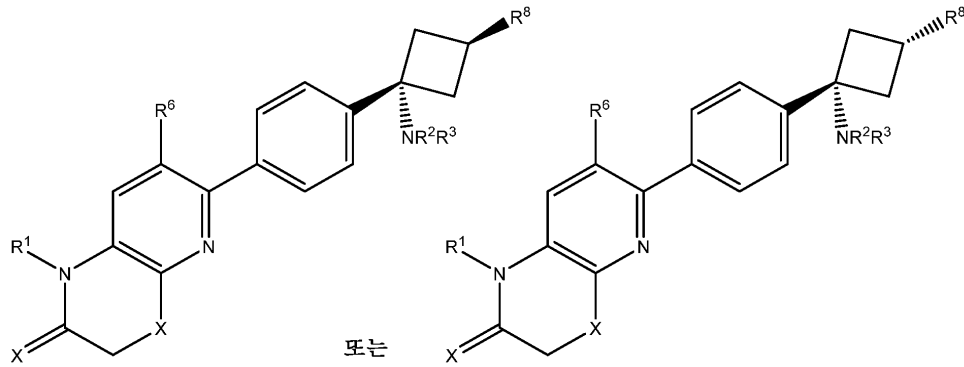
제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, R¹은 -(CH₂)_nCN이고, 여기서, n은 1, 2, 3, 4 또는 5인, 화합물.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, R² 및 R³은 각각 수소인, 화합물.

청구항 10

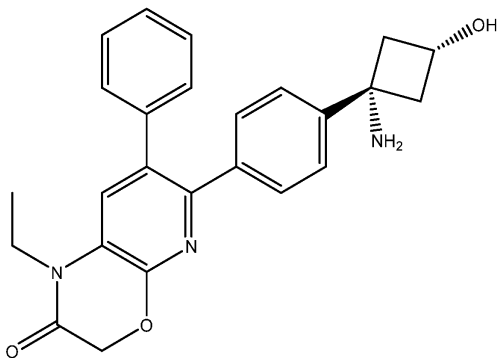
제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화학식 (I)의 화합물은



또는 이의 약제학적으로 허용되는 염이며, 여기서, R^8 은 -OH, -CN, 할로젠, 및 C_1-C_6 알킬로부터 선택되는, 화합물.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화학식 (I)의 화합물은



또는 이의 약제학적으로 허용되는 염인, 화합물.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 약제학적으로 허용되는 염은 타르트레이트 염, 메실레이트 염, 또는 포스페이트 염인, 화합물.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 약제학적으로 허용되는 염은 타르트레이트 염인, 화합물.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 타르트레이트 염은 L-타르트레이트 염인, 화합물.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물은 상기 피험자에 대하여 경구 투여용으로 제형화되는, 화합물.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 피험자는 사람인, 화합물.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 피험자는 성인인, 화합물.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 화학식 (I)의 화합물은 20 내지 75mg Q.D.의 용량으로 상기 피험자에게 투여되는, 화합물.

청구항 19

제17항에 있어서, 상기 화학식 (I)의 화합물은 10 내지 50mg Q.D.의 용량으로 상기 피험자에게 투여되는, 화합물.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 화학식 (I)의 화합물은 20 내지 40mg Q.D.의 용량으로 상기 피험자에게 투여되는, 화합물.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 화학식 (I)의 화합물은 20 내지 30mg Q.D.의 용량으로 상기 피험자에게 투여되는, 화합물.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 HHT의 치료는 HHT 관련된 출혈의 빈도, 기간 또는 세기의 감소를 포함하는, 화합물.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 HHT 관련된 출혈은 위장관(GI) 출혈인, 화합물.

청구항 24

제22항에 있어서, 상기 HHT 관련된 출혈은 코피인, 화합물.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 HHT의 치료는 상기 피험자에서의 헤모글로빈 수치 증가를 포함하는, 화합물.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 HHT의 치료는 상기 피험자에서의 모세혈관확장증의 개수의 감소를 포함하는, 화합물.

청구항 27

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 HHT의 치료는 상기 피험자에서의 모세혈관확장증의 크기의 감소를 포함하는, 화합물.

청구항 28

제26항 또는 제27항에 있어서, 상기 모세혈관확장증은 피부 모세혈관확장증인, 화합물.

청구항 29

제26항 또는 제27항에 있어서, 상기 모세혈관확장증은 비강 모세혈관확장증인, 화합물.

청구항 30

제26항 또는 제27항에 있어서, 상기 모세혈관확장증은 경구 모세혈관확장증인, 화합물.

청구항 31

제26항 또는 제27항에 있어서, 상기 모세혈관확장증은 위장관 모세혈관확장증인, 화합물.

청구항 32

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 HHT의 치료는 상기 피험자에서의 동정맥 기형증(AVM)의 개수

의 감소를 포함하는, 화합물.

청구항 33

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 HHT의 치료는 상기 피험자에서의 동정맥 기형증(AVM)의 크기의 감소를 포함하는, 화합물.

청구항 34

제1항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 HHT의 치료는 상기 피험자에서의 동정맥 기형증(AVM) 형성의 방지를 포함하는, 화합물.

청구항 35

제32항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 동정맥 기형증은 폐 AVM인, 화합물.

청구항 36

제32항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 동정맥 기형증은 대뇌 (뇌) AVM인, 화합물.

청구항 37

제32항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 동정맥 기형증은 내장 AVM인, 화합물.

청구항 38

제1항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 HHT의 치료는 심부전증 및 폐동맥 고혈압(PAH)의 감소를 포함하는, 화합물.

청구항 39

제1항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 HHT의 치료는 심부전증 및 폐동맥 고혈압(PAH)의 예방을 포함하는, 화합물.

청구항 40

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 HHT의 치료는 상기 피험자에서 폐 AVM에 의해 유발된 좌우 선트의 예방을 포함하는, 화합물.

청구항 41

제1항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 HHT의 치료는 상기 피험자에서 폐 AVM에 의해 유발된 좌우 선트의 등급의 감소를 포함하는, 화합물.

청구항 42

제1항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 HHT의 치료는 상기 피험자에서 철분 보충의 필요성의 감소를 포함하는, 화합물.

청구항 43

제1항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 HHT의 치료는 상기 피험자에서 요구되는 수혈의 횟수의 감소를 포함하는, 화합물.

청구항 44

제1항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 HHT의 치료는 간 혈류의 저하를 포함하는, 화합물.

청구항 45

제1항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 HHT의 치료는 상기 피험자에서의 간 이식의 필요성을 감소시키는, 화합물.

청구항 46

제1항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 HHT의 치료는 HHT의 추가 증상의 빈도 및/또는 중증도의 감소를 포함하는, 화합물.

청구항 47

제46항에 있어서, 상기 추가 증상은 호흡곤란, 편두통, 피로, 신경학적 사례, 및/또는 색전증 사례인, 화합물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 알로스테릭 AKT 저해제 및 유전성 출혈성 모세혈관확장증(Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia)(HHT)의 치료에 있어서의 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 유전성 출혈성 모세혈관확장증(HHT)은 전세계적으로 5,000 내지 8,000명 중 1명꼴로 발병하는 상염색체 우성 유전 질환이다. 임상 증상은, 모세혈관의 개입 없이 동맥과 정맥이 직접 연결되는 폐, 대뇌 및 간 동정맥 기형증(arteriovenous malformation)(AVM)을 포함한다. AVM은 치료되지 않으면 생명을 위협하는 합병증을 유발할 수 있다. HHT 환자는 또한 코, 입 및 위장관에 모세혈관확장증이라는 작은 동정맥 기형증이 발생한다. 이러한 취약한(fragile) 혈관은 용이하게 파열되고 출혈되어, 심각하고 빈번한 출혈 에피소드 이후에 재발성 빈혈을 유발한다 (Dupuis-Girod et al., (2010), "Hereditary hemorrhagic telangiectasia: From molecular biology to patient care", Journal of Thrombosis and Haemostasis. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2010.03860.x>; Iriarte et al., (2019), "PI3K (Phosphatidylinositol 3-Kinase) Activation and Endothelial Cell Proliferation in Patients with Hemorrhagic Hereditary Telangiectasia Type 1", Cells. <https://doi.org/10.3390/cells8090971>).

[0003] 현재까지 규명된 돌연변이의 대부분은 2개 유전자에서 발견된다. HHT1은 ENG (엔도글린(endoglin)) 유전자의 돌연변이로 인해 발생하는 반면 HHT2는 ACVRL1 (엑티빈 수용체-유사 키나아제 1, ALK1)의 돌연변이로 인해 발생한다. 이들은 둘 다 주로 내피 세포에서 발현되는 형질전환 성장 인자- β (Transforming Growth Factor- β)(TGF- β)/골 형태발생 단백질(Bone Morphogenetic Protein)(BMP)에 대한 수용체이다. 돌연변이는 반수체기능부전(haploinsufficiency)이 HHT의 근본 원인임을 나타내는 비대립 유전자(null allele)를 나타낸다. ENG 또는 ACVRL1 (ALK1)의 돌연변이가 어떻게 병리학적 혈관신생을 일으키는지는 잘 알려져 있지 않다.

[0004] 원인 유전자 돌연변이의 규명 및 동물 모델의 생성은, 내피 세포에서 형질전환 성장 인자- β (TGF- β)/골 형태발생 단백질(BMP) 신호전달 저해 및 혈관 내피 성장 인자(vascular endothelial growth factor)(VEGF) 신호전달 활성화 증가는 HHT에서 혈관 기형의 발달의 원인임을 밝혀내었다. 이러한 주요 경로의 교란은 내피 세포 활성화로 이어져 내피 세포로부터 벽 세포의 분리를 초래한다 (Galaris et al., (2019), "Pericytes in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia", Advances in Experimental Medicine and Biology. https://doi.org/10.1007/978-3-030-16908-4_10). 이러한 초기 불안정 상태는 혈관신생 유발인자에 노출될 때 혈관이 부적절하게 반응하게 하여 과도한 혈관 성장 및 출혈 경향이 있는 혈관 이상을 형성한다.

[0005] 최근, 마우스 모델 및 시험관 내 실험으로부터의 일련의 연구는 PI3K/AKT 신호전달 경로와 HHT에서 관찰되는 증가된 내피 세포 활성화 사이의 연관성을 밝혀내었다. ALK1 신호전달의 손실은 내피 세포에서 감소된 PTEN에 의해 유도된 증가된 PI3K/AKT 신호와 일치한다 (Jin et al., (2017), "Endoglin prevents vascular malformation by regulating flow-induced cell migration and specification through VEGFR2 signalling", Nature Cell Biology, 19(6), 639-652. <https://doi.org/10.1038/ncb3534>; Ola et al., (2016), "PI3 kinase inhibition improves vascular malformations in mouse models of hereditary haemorrhagic telangiectasia", Nature Communications, 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms13650>; Ola et al. (2018), "SMAD4 Prevents Flow Induced Arteriovenous Malformations by Inhibiting Casein Kinase 2", Circulation, 138(21), 2379-2394). 이러한 관찰은 HHT1 및 HHT2 환자의 피부 모세혈관확장증 생검에서 확인되었으며, 여기서, 증가된 내피 세포 증식은 PI3K/AKT 경로 다운스트림 유전자의 증가와 관련이 있다 (Alsina-Sanchis et al., (2018), "ALK1 loss results in vascular hyperplasia in mice and humans through PI3K activation", Arteriosclerosis,

Thrombosis, and Vascular Biology. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.118.310760>).

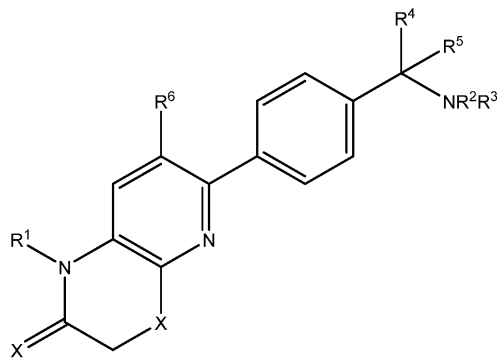
[0006] Pi3K/AKT/mTOR 신호전달의 표적화는 HHT에서 관찰되는 병리학적 혈관신생의 치료 전략을 제공할 수 있다. 그러나, 안전하고 효과적인 치료 제제는 아직 알려지지 않았다. 예를 들어 널리 사용되는 pan Pi3K 저해제인 보르트만닌(Wortmannin)은 ALK1 또는 SMAD4 iKO의 망막 마우스 모델에서 (전술된 Ola et al., (2016), (2018)) 그리고 엔도글린-유도 녹아웃(Endoglin-inducible knockout)(Eng-iKO) 모델에서 (전술된 Jin et al., (2017)) AVM 형성을 저해할 수 있다. 유사하게, 전형적인 mTOR 저해제인 시롤리무스는 Eng-iKO 모델에서 AVM 형성을 차단할 수 없다 (Ruiz et al., (2019), "Sirolimus plus nintedanib treats vascular pathology in HHT mouse models", BioRxiv Cell Biology. <https://doi.org/10.1101/739144>).

[0007] 따라서 효과적이고 허용 가능한 안전성 프로파일을 갖는 HHT 치료용 제제를 제공할 필요가 있다.

발명의 내용

[0008] 본 발명의 제1 측면에 따라, 피험자의 유전성 출혈성 모세혈관확장증(HHT)의 치료에 사용하기 위한 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염이 제공된다:

[0009] 화학식 (I)



[0010]

[0011] 여기서,

[0012] 각각의 X는 독립적으로 O 또는 S이고;

[0013] R¹은 수소 및 C₁-C₁₀ 알킬로부터 선택되고, 여기서, 각각의 C₁-C₁₀ 알킬은 할로젠, -CN, -OR⁷ 또는 3 내지 6원 사이클로알킬로부터 선택된 하나 이상의 치환체로 임의로 치환되고;

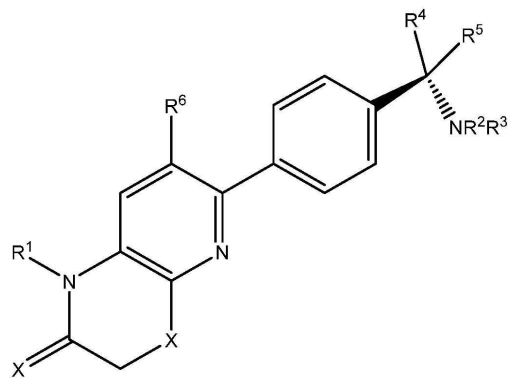
[0014] R² 및 R³은 각각 독립적으로 수소 및 C₁-C₁₀ 알킬로부터 선택되거나; R² 및 R³은, 이들이 부착되어 있는 질소 원자와 함께, 3 내지 6원 헤테로사이클릭 환을 형성하고;

[0015] R⁴ 및 R⁵는 각각 독립적으로 C₁-C₆ 알킬, C₂-C₆ 알케닐, 또는 C₂-C₆ 알키닐로부터 선택되거나; R⁴ 및 R⁵는, 이들이 부착되어 있는 탄소 원자와 함께, C₁-C₁₀ 알킬, -CN, -OR⁷, 할로젠, -COR⁷, CO₂R⁷, CONR⁷₂ 및 -NR⁷₂로부터 선택된 하나 이상의 치환체로 임의로 치환된 3 내지 6원 사이클로알킬 또는 헤테로사이클릭 환을 형성하고;

[0016] R⁶은 C₁-C₁₀ 알킬, -CN, -OR⁷, 할로젠, -COR⁷, CO₂R⁷, CONR⁷₂ 및 -NR⁷₂로부터 선택된 하나 이상의 치환체로 임의로 치환된 5 내지 7원 아릴 또는 헤테로아릴 환이고;

[0017] 각각의 R⁷은 독립적으로 수소 및 C₁-C₁₀ 알킬로부터 선택된다.

[0018] 일부 양태에서, 화학식 (I)의 화합물은 하기 구조를 갖는다:



[0019]

[0020] 일부 양태에서, R^6 은 C_1 - C_{10} 알킬, $-CN$, $-OR^7$, 할로젠, $-COR^7$, CO_2R^7 , $CONR^7_2$ 및 $-NR^7_2$ 로부터 선택된 하나 이상의 치환체로 치환된 페닐이다. 일부 양태에서, 하나 이상의 치환체는 C_1 - C_6 알킬, $-CN$, $-OH$ 및 할로젠으로부터 선택된다. 다른 양태에서, R^6 은 치환되지 않은 페닐이다.

[0021] 일부 양태에서, R^6 은 C_1 - C_{10} 알킬, $-CN$, $-OR^7$, 할로젠, $-COR^7$, CO_2R^7 , $CONR^7_2$ 및 $-NR^7_2$ 로부터 선택된 하나 이상의 치환체로 치환된 5 내지 7원 헤테로아릴 환이다. 일부 양태에서, 하나 이상의 치환체는 C_1 - C_6 알킬, $-CN$, $-OH$ 및 할로젠으로부터 선택된다. 다른 양태에서, R^6 은 치환되지 않은 5 내지 7원 헤테로아릴 환이다. 특정 양태에서, 헤테로아릴 환은 6원 헤테로아릴 환이다. 일부 양태에서, 헤테로아릴 환은 적어도 하나의 질소 원자를 함유한다. 일부 양태에서, 헤테로아릴 환은 적어도 하나의 산소 원자를 함유한다. 일부 양태에서, 헤테로아릴 환은 적어도 하나의 황 원자를 함유한다. 예를 들면, 헤테로아릴 환은 피리딘, 피란, 티오피란, 피롤, 푸란 또는 티오펜일 수 있다.

[0022] 일부 양태에서, R^4 및 R^5 는, 이들이 부착되어 있는 탄소 원자와 함께, 치환되지 않은 3 내지 6원 사이클로알킬 또는 헤테로사이클릭 환을 형성한다. 다른 양태에서 R^4 및 R^5 는, 이들이 부착되어 있는 탄소 원자와 함께, 치환되지 않은 3 내지 6원 사이클로알킬 또는 헤테로사이클릭 환을 형성하며, 이는 C_1 - C_{10} 알킬, $-CN$, $-OR^7$, 할로젠, $-COR^7$, CO_2R^7 , $CONR^7_2$ 및 $-NR^7_2$ 로부터 선택된 하나 이상의 치환체로 치환된다. 예를 들면, 사이클로알킬 환은 사이클로프로필 환, 사이클로부틸 환, 사이클로펜틸 환, 또는 사이클로헥실 환일 수 있다. 일부 양태에서, 헤테로사이클릭 환은 적어도 하나의 질소 원자를 함유한다. 일부 양태에서, 헤테로사이클릭 환은 적어도 하나의 산소 원자를 함유한다. 일부 양태에서, 헤테로사이클릭 환은 적어도 하나의 황 원자를 함유한다. 예를 들면, 헤테로사이클릭 환은 피페리딘, 테트라하이드로피란, 티안, 피롤리딘, 테트라하이드로푸란, 또는 테트라하이드로티오펜일 수 있다.

[0023] 일부 양태에서, R^4 및 R^5 는, 이들이 부착되어 있는 탄소 원자와 함께, 치환되지 않은 사이클로프로필, 사이클로부틸, 사이클로펜틸, 또는 사이클로헥실 환을 형성한다. 다른 양태에서, 사이클로프로필, 사이클로부틸, 사이클로펜틸, 또는 사이클로헥실 환은 C_1 - C_{10} 알킬, $-CN$, $-OR^7$, 할로젠, $-COR^7$, CO_2R^7 , $CONR^7_2$ 및 $-NR^7_2$ 로부터 선택된 하나 이상의 치환체로 치환된다. 일부 양태에서, 하나 이상의 치환체는 C_1 - C_6 알킬, $-CN$, $-OH$ 및 할로젠으로부터 선택된다. 일부 양태에서, R^4 및 R^5 는, 이들이 부착되어 있는 탄소 원자와 함께, 치환되지 않은 사이클로부틸 환을 형성한다. 다른 양태에서, 사이클로부틸 환은 C_1 - C_{10} 알킬, $-CN$, $-OR^7$, 할로젠, $-COR^7$, CO_2R^7 , $CONR^7_2$ 및 $-NR^7_2$ 로부터 선택된 하나 이상의 치환체로 치환된다. 일부 양태에서, 하나 이상의 치환체는 C_1 - C_6 알킬, $-CN$, $-OH$ 및 할로젠으로부터 선택된다.

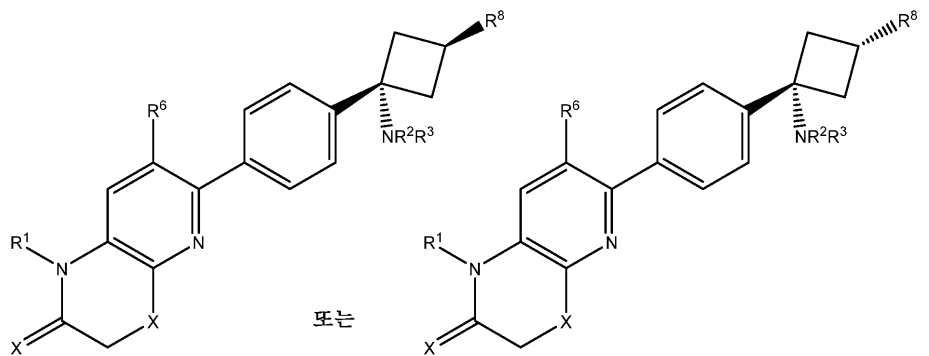
[0024] 일부 양태에서, 각각의 X는 O이다.

[0025] 일부 양태에서, R^1 은 치환되지 않은 C_1 - C_{10} 알킬, 치환되지 않은 C_1 - C_6 알킬, 또는 치환되지 않은 C_1 - C_4 알킬이다.

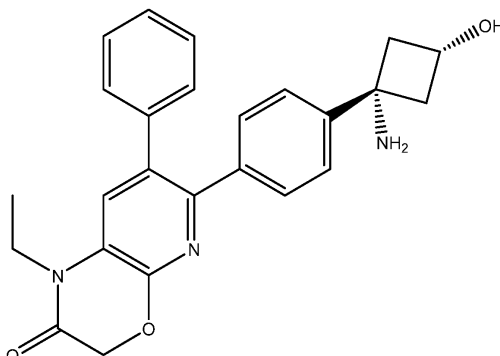
일부 양태에서, R^1 은 메틸, 에틸, 프로필, 부틸, 펜틸 또는 헥실이다. 일부 양태에서, R^1 은 메틸, 에틸, n-프로필, i-프로필, n-부틸, i-부틸, 또는 t-부틸이다. 일부 양태에서, R^1 은 메틸 또는 에틸이다. 일부 양태에서, R^1 은 할로젠, -CN, -OH 또는 3 내지 6원 사이클로알킬로부터 선택된 하나 이상의 치환체로 치환된 C_1 - C_{10} 알킬, C_1 - C_6 알킬, 또는 C_1 - C_4 알킬이다. 일부 양태에서, R^1 은 $-(CH_2)_nCN$ 이고, 여기서, n은 1, 2, 3, 4 또는 5이다.

[0026] 일부 양태에서, R^2 및 R^3 은 각각 독립적으로 수소 및 C_1 - C_{10} 알킬로부터 선택된다. 일부 양태에서, R^2 및 R^3 은 각각 독립적으로 수소 및 C_1 - C_6 알킬로부터 선택된다. 일부 양태에서, R^2 및 R^3 은 각각 독립적으로 수소, 메틸 및 에틸로부터 선택된다. 일부 양태에서, R^2 및 R^3 은 각각 수소이다.

[0027] 일부 양태에서, 화학식 (I)의 화합물은



또는 이의 약제학적으로 허용되는 염이며, 여기서, R^8 은 -OH, -CN, 할로젠, 및 C_1 - C_6 알킬로부터 선택된다.



[0028] 일부 양태에서, 화학식 (I)의 화합물은 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염이다.

[0029] 일부 양태에서, 약제학적으로 허용되는 염은 타르트레이트 염, 메실레이트 염, 또는 포스페이트 염이다. 일부 양태에서, 약제학적으로 허용되는 염은 타르트레이트 염이다. 이러한 일부 양태에서, 타르트레이트 염은 L-타르트레이트 염이다.

[0030] 일부 양태에서, 화합물은 피험자에 대하여 경구 투여용으로 제형화된다.

[0031] 일부 양태에서, 피험자는 사람이다. 일부 양태에서, 피험자는 성인 사람이다. 이러한 일부 양태에서, 화학식 (I)의 화합물은 20 내지 75mg Q.D.의 용량으로 피험자에게 투여된다. 이러한 다른 양태에서, 화학식 (I)의 화합물은 10 내지 50mg Q.D., 20 내지 40mg Q.D., 또는 20 내지 30mg Q.D.의 용량으로 피험자에게 투여된다.

[0032] 일부 양태에서, HHT의 치료는 HHT 관련된 출혈의 빈도, 기간 또는 세기의 감소를 포함한다. 이러한 일부 양태에서, HHT 관련된 출혈은 위장관(GI) 출혈이다. 일부 양태에서, HHT 관련된 출혈은 코피이다.

[0033] 일부 양태에서, HHT의 치료는 피험자에서의 헤모글로빈 수치의 증가를 포함한다.

[0034] 일부 양태에서, HHT의 치료는 피험자에서의 모세혈관확장증의 개수의 감소를 포함한다. 일부 양태에서, HHT의 치료는 피험자에서의 모세혈관확장증의 크기의 감소를 포함한다. 일부 양태에서, 모세혈관확장증은 피부 모세혈

관확장증이다. 일부 양태에서, 모세혈관확장증은 비강 모세혈관확장증이다. 일부 양태에서, 모세혈관확장증은 경구 모세혈관확장증이다. 일부 양태에서, 모세혈관확장증은 위장관 모세혈관확장증이다.

- [0035] 일부 양태에서, HHT의 치료는 피험자에서의 동정맥 기형증(AVM)의 개수 및 크기의 감소를 포함한다. 일부 양태에서, HHT의 치료는 피험자에서의 AVM 형성의 방지를 포함한다. 이러한 일부 양태에서, 동정맥 기형증은 폐 AVM이다. 일부 양태에서, 동정맥 기형증은 대뇌 (뇌) AVM이다. 일부 양태에서, 동정맥 기형증은 내장 AVM이다.
- [0036] 일부 양태에서, HHT의 치료는 심부전증 및 폐동맥 고혈압(pulmonary arterial hypertension)(PAH)의 감소를 포함한다. 일부 양태에서, HHT의 치료는 심부전증 및 폐동맥 고혈압(PAH)의 예방을 포함한다.
- [0037] 일부 양태에서, HHT의 치료는 피험자에서 폐 AVM에 의해 유발된 좌우 선트(right to left shunt)의 예방을 포함한다. 일부 양태에서, HHT의 치료는 피험자에서 폐 AVM에 의해 유발된 좌우 선트의 등급의 감소를 포함한다.
- [0038] 일부 양태에서, HHT의 치료는 피험자에서 철분 보충의 필요성의 감소, 예를 들면 피험자에 의해 요구되는 철분 주입 횟수의 감소를 포함한다. 일부 양태에서, HHT의 치료는 피험자에서 요구되는 수혈의 횟수의 감소를 포함한다.
- [0039] 일부 양태에서, HHT의 치료는 간 혈류의 저하를 포함한다.
- [0040] 일부 양태에서, HHT의 치료는 피험자에서의 간 이식의 필요성을 감소시킨다.
- [0041] 일부 양태에서, HHT의 치료는 HHT의 추가 증상의 빈도 및/또는 중증도의 감소를 포함한다. 이러한 추가 증상은 호흡곤란, 편두통, 피로, 신경학적 사례(evnet), 및 색전증 사례를 포함할 수 있다.
- [0042] 또한 본 발명은, 유전성 출혈성 모세혈관확장증(HHT) 치료용 약제를 제조하기 위한, 전술된 양태 중 어느 것에 정의된 바와 같은 화학식 (I)의 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염의 용도를 제공한다.
- [0043] 또한 본 발명은, 전술된 양태 중 어느 것에 정의된 바와 같은 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 유전성 출혈성 모세혈관확장증(HHT)의 치료를 필요로 하는 피험자에게 유효량으로 투여함을 포함하는, 상기 피험자의 유전성 출혈성 모세혈관확장증(HHT)을 치료하는 방법을 제공한다.
- [0044] 일부 양태에서, HHT의 치료 방법은 HHT 관련된 출혈의 빈도, 기간 또는 세기의 감소를 초래한다. 이러한 일부 양태에서, HHT 관련된 출혈은 위장관(GI) 출혈이다. 일부 양태에서, HHT 관련된 출혈은 코피이다.
- [0045] 일부 양태에서, HHT의 치료 방법은 피험자에서의 헤모글로빈 수치에의 증가를 초래한다.
- [0046] 일부 양태에서, HHT의 치료 방법은 피험자에서의 모세혈관확장증의 개수의 감소를 초래한다. 일부 양태에서, HHT의 치료 방법은 피험자에서의 모세혈관확장증의 크기의 감소를 초래한다. 일부 양태에서, 모세혈관확장증은 피부 모세혈관확장증이다. 일부 양태에서, 모세혈관확장증은 비강 모세혈관확장증이다. 일부 양태에서, 모세혈관확장증은 경구 모세혈관확장증이다. 일부 양태에서, 모세혈관확장증은 위장관 모세혈관확장증이다.
- [0047] 일부 양태에서, HHT의 치료 방법은 피험자에서의 동정맥 기형증(AVM)의 개수의 감소를 초래한다. 일부 양태에서, HHT의 치료 방법은 피험자에서의 동정맥 기형증(AVM)의 크기의 감소를 초래한다. 일부 양태에서, 상기 방법은 피험자에서의 AVM 형성을 방지한다. 이러한 일부 양태에서, 동정맥 기형증은 폐 AVM이다. 일부 양태에서, 동정맥 기형증은 뇌 AVM이다. 일부 양태에서, 동정맥 기형증은 내장 AVM이다.
- [0048] 일부 양태에서, HHT의 치료 방법은 피험자의 삶의 질의 개선을 초래한다.
- [0049] 일부 양태에서, HHT의 치료 방법은 심부전증 및 폐동맥 고혈압(PAH)의 감소를 초래한다. 일부 양태에서, HHT의 치료 방법은 심부전증 및 폐동맥 고혈압(PAH)의 예방을 초래한다.
- [0050] 일부 양태에서, HHT의 치료 방법은 피험자에서 폐 AVM에 의해 유발된 좌우 선트를 예방한다. 일부 양태에서, HHT의 치료 방법은 피험자에서 폐 AVM에 의해 유발된 좌우 선트의 등급의 감소를 초래한다.
- [0051] 일부 양태에서, HHT의 치료 방법은 피험자에서 철분 보충의 필요성의 감소, 예를 들면 피험자에 의해 요구되는 철분 주입 횟수의 감소를 초래한다. 일부 양태에서, HHT의 치료 방법은 피험자에서 요구되는 수혈의 횟수의 감소를 초래한다.
- [0052] 일부 양태에서, HHT의 치료 방법은 간 혈류의 저하를 초래한다.
- [0053] 일부 양태에서, HHT의 치료 방법은 피험자에서의 간 이식의 필요성을 감소시킨다.

[0054] 일부 양태에서, HHT의 치료 방법은 HHT의 추가 증상의 빈도 및/또는 중증도의 감소를 초래한다. 이러한 추가 증상은 호흡곤란, 편두통, 피로, 신경학적 사례, 및 색전증 사례를 포함할 수 있다.

[0055] 일부 양태에서, HHT의 치료 방법은 피험자의 삶의 질의 전반적인 개선을 초래한다.

도면의 간단한 설명

[0056] 도 1a는 AKT2와 복합된 화합물 6의 전체 구조를 보여준다. 도 1b는 알로스테릭 포켓을 확대하고 아미노산 상호작용을 보여주는 복합체의 구조를 보여준다. 도 1c는 아미노산 상호작용의 개략도이다.

도 1d는 AKT2와 복합된 VAD044의 유리 염기의 구조를 보여준다 (알로스테릭 포켓을 확대하고 아미노산 상호작용을 나타냄). 도 1e는 아미노산 상호작용의 개략도이다.

도 2a는 서로 다른 키나아제의 상대적인 서열 상동성을 보여주는 트리 다이어그램이다(여기서, 동일한 분기(branch)에 존재하고 서로 인접하여 위치한 키나아제는 높은 수준의 서열 상동성을 갖는 반면, 상이한 분기에 위치한 키나아제는 매우 상이한 서열 상동성을 갖는다). 도 2a에 도시된 바와 같이, AKT1, AKT2 및 AKT3은 매우 높은 수준의 서열 상동성을 갖는다. PDK1은 AKT1/2/3과 동일한 주 분기(main branch)("AGC"로 표시됨)에 위치하며 이는 AKT1/2/3과 상대적으로 높은 수준의 서열 상동성을 나타내는 반면; p38 α 는 완전히 상이한 주 분기 상에 있으며 ("CMGC"로 표시됨) 이는 AKT1/2/3과 p38 α 사이에 낮은 수준의 서열 상동성을 나타낸다. 도 2b는 VAD044 (6-(4-(1-아미노-3-하이드록시사이클로부틸)페닐)-1-에틸-7-페닐-1H-피리도[2,3-b][1,4]옥사진-2(3H)-온 L-타르트레이트)에 의해 달성된, 선택된 이들 5개 키나아제(AKT1, AKT2, AKT3, PDK1 및 p38 α)의 저해율(%)을 보여준다.

도 3은 페리포신(Perifosine)의 안전성 및 잠재적 독성을 보여준다. 도 3a는 새끼(pup) 치사율을 보여주고 도 3b는 출생후 4일(P4)과 P7 사이의 동물 체중 차이를 보여준다. 모든 오류 막대는 S.E.M.을 나타낸다.

**** $p < 0.0001$ 은, 각 군의 평균을 비히클만을 주입한 대조군과 비교한 일원 Anova 및 더넷(Dunnett) 사후 시험으로부터의 결과이다. "ns" = 유의하지 않음(non significant).

도 4는 페리포신이 마우스에서 불량한 항혈관신생 특성을 갖고 있음을 보여준다. 도 4a는 P4에서 비히클 단독 또는 5, 10, 25, 50 또는 100mg.kg⁻¹의 페리포신을 복강내 주사한 후 P7에서 야생형 마우스의 망막 혈관에서 이소렉틴 B4로 염색된 내피 세포를 보여준다. 하단에는 혈관 네트워크의 더 높은 배율이 있다. 도 4b는 방사형 확장(radial expansion)의 정량화를 보여주고, 도 4c는 이소렉틴-B4-양성 표면적을 보여주고, 도 4d는 필드당 분기점의 수를 보여준다. 모든 오류 막대는 S.E.M.을 나타낸다. * $p < 0.05$ 및 ** $p < 0.01$ 은 각 군의 평균을 비히클만으로 처리한 대조군과 비교한 일원 아노바 및 더넷 사후 시험으로부터의 결과이다. "ns" = 유의하지 않음.

도 5는 Eng-iKO 마우스 모델에서 AVM 형성을 방지하기 위한 페리포신의 유효성을 보여준다. 도 5a는 페리포신의 주사 방식의 예시이다. 도 5b는 내피 세포를 나타내기 위해 이소렉틴-B4로 염색된 Eng-iKO 망막에 대한 페리포신의 효과를 보여주는 공초점 이미지를 보여준다. 하단에는 혈관 네트워크의 더 높은 배율이 있다. 도 5c는 마우스당 AV 선트의 수를 보여준다. 도 5d는 방사형 확장의 정량화를 보여주고, 도 5e는 이소렉틴-B4-양성 영역을 보여주고, 도 5f는 필드당 분기점의 수를 보여준다. 모든 오류 막대는 S.E.M.을 나타낸다. * $p < 0.05$ 는 각 군의 평균을 Eng-iKO 군과 비교한 일원 아노바 및 더넷 사후 시험으로부터의 결과이다. "ns" = 유의하지 않음.

도 6은 우프로셀팁(Uprosertib)의 안전성 및 잠재적 독성을 보여준다. 도 6a는 새끼 치사율을 보여주고 도 6b는 출생후 4일(P4)과 P7 사이의 동물 체중 차이를 보여준다. 모든 오류 막대는 S.E.M.을 나타낸다. * $p < 0.05$ 은, 각 군의 평균을 비히클만을 주입한 대조군과 비교한 일원 아노바 및 더넷 사후 시험으로부터의 결과이다. "ns" = 유의하지 않음.

도 7은 마우스에서의 우프로셀팁의 항혈관신생 특성을 보여준다. 도 7a는 P4에서 비히클 단독 또는 2.5, 5, 10, 25mg.kg⁻¹의 페리포신을 복강내 주사한 후 P7에서 야생형 마우스의 망막 혈관에서 이소렉틴 B4로 염색된 내피 세포를 보여준다. 하단에는 혈관 네트워크의 더 높은 배율이 있다. 도 7b는 방사형 확장의 정량화를 보여주고, 도 7c는 이소렉틴-B4-양성 표면적을 보여주고, 도 7d는 필드당 분기점의 수를 보여준다. 모든 오류 막대는 S.E.M.을 나타낸다. * $p < 0.0$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 및 **** $p < 0.0001$ 은 각 군의 평균을 비히클만으로 처리한 대조군과 비교한 일원 아노바 및 더넷 사후 시험으로부터의 결과이다. "ns" = 유의하지 않음.

도 8a는 우프로설립의 주사 방식의 예시이고, 도 8b는 새끼 치사율을 보여준다. EngFlox/flox; cdh5-CreERT2 동물에게 P2에서 타목시펜($50\mu\text{g}$)을 주사하여 신생아 마우스에서 거의 완전한 유전자 녹아웃을 유도한 다음 0 또는 $5\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 체중의 우프로설립을 P3 및 P5에서 1회 IP 주사하였다. 동일한 체적의 비히클을 대조군 동물에게 주사하였다.

도 9a는 VAD044의 주사 방식의 예시이고, 도 9b는 새끼 치사율을 보여준다. EngFlox/flox; cdh5-CreERT2 동물에게 P2에서 타목시펜($50\mu\text{g}$)을 주사하여 신생아 마우스에서 거의 완전한 유전자 녹아웃을 유도한 다음 0, 2.5, 5 또는 $10\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 체중의 VAD044를 P3 및 P5에서 1회 IP 주사하였다. 동일한 체적의 비히클을 대조군 동물에게 주사하였다. 이어서 마우스를 P7에서 사멸시키고 망막을 설명된 바와 같이 면역형광법 염색(immunofluorescence staining)을 위해 처리하였다 (Lebrin et al., 2010).

도 10은 Eng-iKO 마우스 모델에서 AVM 형성을 방지하기 위한 VAD044의 유효성을 보여준다. 도 10a는 내피 세포를 나타내기 위해 이소렉틴-B4로 염색된 Eng-iKO 망막에 대한 VAD044의 효과를 보여주는 공초점 이미지를 보여준다. 도 10b는 마우스당 AV 선트의 수를 보여준다. 도 10c는 방사형 확장의 정량화를 보여주고, 도 10d는 이소렉틴-B4-양성 영역을 보여주고, 도 10e는 필드당 분기점의 수를 보여준다. 모든 오류 막대는 S.E.M.을 나타낸다. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ 및 *** $p<0.001$ 은 각 군의 평균을 Eng-iKO 군과 비교한 일원 아노바 및 더넷 사후 시험으로부터의 결과이다. "ns" = 유의하지 않음.

도 11은 Eng-iKO 마우스의 폐로부터의 1차 마우스 내피 세포의 단리 및 특성화 및 상피 세포에서 Eng 유전자의 결실(및 이어지는 Eng 단백질의 결실)을 유도하기 위한 Cre 재조합효소의 아테노바이러스 감염을 위한 방법을 보여준다.

도 12는 정상 및 Eng-결실된 내피 세포(EC)에서의 AKT 및 SMAD 신호전달을 보여준다.

도 13a는 정상 및 Eng-iKO EC에서 엔도글린 발현에 대한 Cre 아테노바이러스 감염의 영향을 보여준다. 도 13b는 정상적인 수준의 Eng 발현을 갖는 마우스 폐 내피 세포에서, 및 Eng 발현의 완전한 손실을 나타내는 폐 마우스 폐 내피 세포에서의 VAD-044의 IC50을 보여준다. 도 13c는 p42/p44 인산화를 나타내며, 이는 선택성에 대한 대조군으로서 분석되었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0057] 위에서 논의한 바와 같이, Pi3K/AKT/mTOR 신호전달 경로의 표적화는 HHT 치료를 위한 치료 전략을 제공할 수 있다. 그러나, 안전하고 효과적인 치료 제제는 아직 알려지지 않았다.

[0058] AKT는 AKT1, AKT2 및 AKT3의 3개 동형을 갖는 세린/트레오닌 단백질 키나아제이다. AKT1은 새싹 신장(sprout elongation) 및 혈관 재형성과 같은 혈관신생 신호전달의 여러 측면들을 촉진하는 중요한 다운스트림 이펙터(예를 들면, eNOS, Ang2 및 FOXO)를 조절함으로써 내피 세포에서 필수적인 기능을 갖는다 (Lee et al., (2014), "Endothelial Akt1 mediates angiogenesis by phosphorylating multiple angiogenic substrates", Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. <https://doi.org/10.1073/pnas.1408472111>). 여러 연구에서, 지속적인 내피 AKT 활성화가 만성 혈관 투과성으로 인해 증가된 혈관 크기 및 일반화된 부종을 유발하는 것으로 나타났다 (Phung et al., (2006), "Pathological angiogenesis is induced by sustained Akt signaling and inhibited by rapamycin", Cancer Cell. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.07.003>). 유사하게, 내피 세포에서 AKT1의 통제되지 않은 활성화는 생체내 혈관 기형을 유도한다 (Perry et al., (2007), "AKT1 overexpression in endothelial cells leads to the development of cutaneous vascular malformations in vivo", Archives of Dermatology. <https://doi.org/10.1001/archderm.143.4.50>). 따라서 AKT는 HHT에서 관찰되는 병리학적 혈관신생 및 혈관 기형을 제어하는 주요 분자 표적이 될 수 있다.

[0059] 본 발명자는 상이한 유형의 AKT 저해제를 시험하여, 이의 독성 프로파일, 정상적인 혈관신생에 끼치는 영향, 및 HHT의 마우스 모델에서의 혈관 기형 발달 방지 능력을 평가하였다. 결과는 하기 실시예에서 상세히 논의된다.

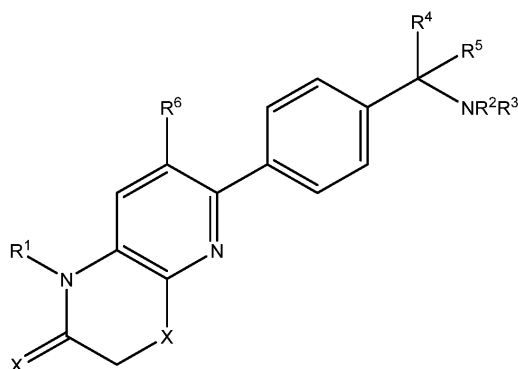
[0060] 요약하면, 본 발명자는 놀랍게도 화학식 (I)을 갖는 특정한 알로스테릭 AKT 저해제가 HHT 1형(HHT1)의 Eng-iKO 마우스 모델에서 혈관 기형의 발달을 방지할 수 있음을 밝혀내었다. 하기 실시예에서 보다 상세히 논의된 바와 같이, 이러한 화합물(및 2개의 다른 비교용 AKT 저해제)의 안전성/독성 프로파일을 얻었으며, 출생후 7일에 C57BL/6J 야생형 마우스에서의 혈관신생 저해를 위한 각 화합물의 최소 유효 용량을 신생아 망막 혈관신생 모델

을 사용하여 판정하였다. Eng-iKO 마우스에서 동정맥 기형증(AVM)의 발달을 방지하기 위한 각 화합물의 최소 유효 용량을 또한 각 화합물에 대해 판정하였다.

[0061] 본 발명자는, 이례적으로, 화학식 (I)의 알로스테릭 AKT 저해제가 놀랍게도 낮은 투여량(종양학에서 전형적으로 사용되는 투여량보다 약 10배 더 낮은 투여량)으로 HHT 관련된 혈관 기형을 치료 및/또는 예방할 수 있음을 밝혀내었으며, 허용되는 안전 프로파일을 입증하였다.

[0062] 따라서, 제1 측면에서, 본 발명은 피험자의 HHT의 치료에 사용하기 위한 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 제공한다.

[0063] 화학식 (I)



[0064]

여기서,

[0065]

각각의 X는 독립적으로 O 또는 S이고;

[0066]

R¹은 수소 및 C₁-C₁₀ 알킬로부터 선택되고, 여기서, 각각의 C₁-C₁₀ 알킬은 할로젠, -CN, -OR⁷ 또는 3 내지 6원 사이클로알킬로부터 선택된 하나 이상의 치환체로 임의로 치환되고;

[0067]

R² 및 R³은 각각 독립적으로 수소 및 C₁-C₁₀ 알킬로부터 선택되거나; R² 및 R³은, 이들이 부착되어 있는 질소 원자와 함께, 3 내지 6원 헤테로사이클릭 환을 형성하고;

[0068]

R⁴ 및 R⁵는 각각 독립적으로 C₁-C₆ 알킬, C₂-C₆ 알케닐, 또는 C₂-C₆ 알키닐로부터 선택되거나; R⁴ 및 R⁵는, 이들이 부착되어 있는 탄소 원자와 함께, C₁-C₁₀ 알킬, -CN, -OR⁷, 할로젠, -COR⁷, CO₂R⁷, CONR⁷₂ 및 -NR⁷₂로부터 선택된 하나 이상의 치환체로 임의로 치환된 3 내지 6원 사이클로알킬 또는 헤테로사이클릭 환을 형성하고;

[0069]

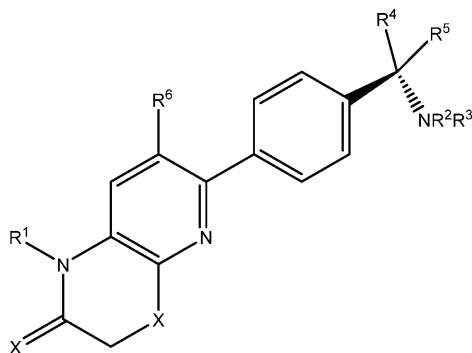
R⁶은 C₁-C₁₀ 알킬, -CN, -OR⁷, 할로젠, -COR⁷, CO₂R⁷, CONR⁷₂ 및 -NR⁷₂로부터 선택된 하나 이상의 치환체로 임의로 치환된 5 내지 7원 아릴 또는 헤테로아릴 환이고;

[0070]

각각의 R⁷은 독립적으로 수소 및 C₁-C₁₀ 알킬로부터 선택된다.

[0071]

[0072] 일부 양태에서, 화학식 (I)의 화합물은 하기 구조를 갖는다:



[0073]

[0074] 일부 양태에서, R⁶은 C₁-C₁₀ 알킬, -CN, -OR⁷, 할로젠, -COR⁷, CO₂R⁷, CONR⁷₂ 및 -NR⁷₂로부터 선택된 하나 이상의 치환체로 치환된 페닐이다. 일부 양태에서, 하나 이상의 치환체는 C₁-C₆ 알킬, -CN, -OH 및 할로젠으로부터 선택된다. 다른 양태에서, R⁶은 치환되지 않은 페닐이다.

[0075] 일부 양태에서, R⁶은 C₁-C₁₀ 알킬, -CN, -OR⁷, 할로젠, -COR⁷, CO₂R⁷, CONR⁷₂ 및 -NR⁷₂로부터 선택된 하나 이상의 치환체로 치환된 5 내지 7원 헤테로아릴 환이다. 일부 양태에서, 하나 이상의 치환체는 C₁-C₆ 알킬, -CN, -OH 및 할로젠으로부터 선택된다. 다른 양태에서, R⁶은 치환되지 않은 5 내지 7원 헤테로아릴 환이다. 특정 양태에서, 헤테로아릴 환은 6원 헤테로아릴 환이다. 일부 양태에서, 헤테로아릴 환은 적어도 하나의 질소 원자를 함유한다. 일부 양태에서, 헤테로아릴 환은 적어도 하나의 산소 원자를 함유한다. 일부 양태에서, 헤테로아릴 환은 적어도 하나의 황 원자를 함유한다. 예를 들면, 헤테로아릴 환은 피리딘, 피란, 티오피란, 피롤, 푸란 또는 티오펜일 수 있다.

[0076] 일부 양태에서, R⁴ 및 R⁵는, 이들이 부착되어 있는 탄소 원자와 함께, 치환되지 않은 3 내지 6원 사이클로알킬 또는 헤테로사이클릭 환을 형성한다. 다른 양태에서 R⁴ 및 R⁵는, 이들이 부착되어 있는 탄소 원자와 함께, 치환되지 않은 3 내지 6원 사이클로알킬 또는 헤테로사이클릭 환을 형성하며, 이는 C₁-C₁₀ 알킬, -CN, -OR⁷, 할로젠, -COR⁷, CO₂R⁷, CONR⁷₂ 및 -NR⁷₂로부터 선택된 하나 이상의 치환체로 치환된다. 예를 들면, 사이클로알킬 환은 사이클로프로필 환, 사이클로부틸 환, 사이클로펜틸 환, 또는 사이클로헥실 환일 수 있다. 일부 양태에서, 헤테로사이클릭 환은 적어도 하나의 질소 원자를 함유한다. 일부 양태에서, 헤테로사이클릭 환은 적어도 하나의 산소 원자를 함유한다. 일부 양태에서, 헤테로사이클릭 환은 적어도 하나의 황 원자를 함유한다. 예를 들면, 헤테로사이클릭 환은 피페리딘, 테트라하이드로피란, 티안, 피롤리딘, 테트라하이드로푸란, 또는 테트라하이드로티오펜일 수 있다.

[0077] 일부 양태에서, R⁴ 및 R⁵는, 이들이 부착되어 있는 탄소 원자와 함께, 치환되지 않은 사이클로프로필, 사이클로부틸, 사이클로펜틸, 또는 사이클로헥실 환을 형성한다. 다른 양태에서, 사이클로프로필, 사이클로부틸, 사이클로펜틸, 또는 사이클로헥실 환은 C₁-C₁₀ 알킬, -CN, -OR⁷, 할로젠, -COR⁷, CO₂R⁷, CONR⁷₂ 및 -NR⁷₂로부터 선택된 하나 이상의 치환체로 치환된다. 일부 양태에서, 하나 이상의 치환체는 C₁-C₆ 알킬, -CN, -OH 및 할로젠으로부터 선택된다. 일부 양태에서, R⁴ 및 R⁵는, 이들이 부착되어 있는 탄소 원자와 함께, 치환되지 않은 사이클로부틸 환을 형성한다. 다른 양태에서, 사이클로부틸 환은 C₁-C₁₀ 알킬, -CN, -OR⁷, 할로젠, -COR⁷, CO₂R⁷, CONR⁷₂ 및 -NR⁷₂로부터 선택된 하나 이상의 치환체로 치환된다. 일부 양태에서, 하나 이상의 치환체는 C₁-C₆ 알킬, -CN, -OH 및 할로젠으로부터 선택된다.

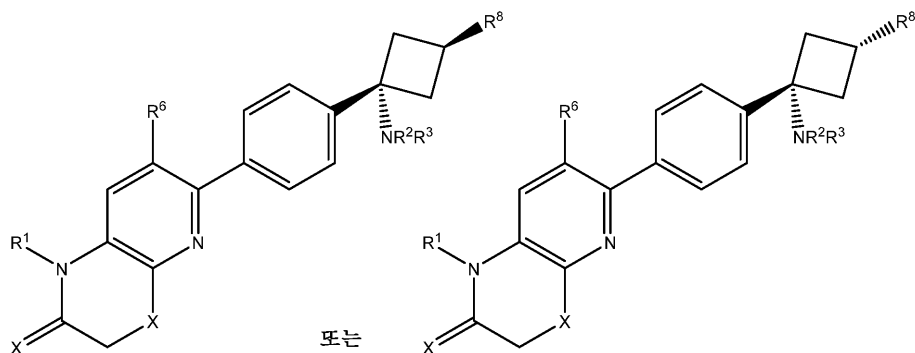
[0078] 일부 양태에서, 각각의 X는 O이다.

[0079] 일부 양태에서, R¹은 치환되지 않은 C₁-C₁₀ 알킬, 치환되지 않은 C₁-C₆ 알킬, 또는 치환되지 않은 C₁-C₄ 알킬이다.

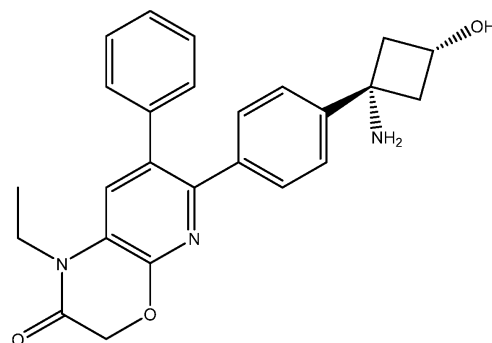
일부 양태에서, R^1 은 메틸, 에틸, 프로필, 부틸, 펜틸 또는 헥실이다. 일부 양태에서, R^1 은 메틸, 에틸, n-프로필, i-프로필, n-부틸, i-부틸, 또는 t-부틸이다. 일부 양태에서, R^1 은 메틸 또는 에틸이다. 일부 양태에서, R^1 은 할로젠, -CN, -OH 또는 3 내지 6원 사이클로알킬로부터 선택된 하나 이상의 치환체로 치환된 C_1 - C_{10} 알킬, C_1 - C_6 알킬, 또는 C_1 - C_4 알킬이다. 일부 양태에서, R^1 은 $-(CH_2)_nCN$ 이고, 여기서, n은 1, 2, 3, 4 또는 5이다.

[0080] 일부 양태에서, R^2 및 R^3 은 각각 독립적으로 수소 및 C_1 - C_{10} 알킬로부터 선택된다. 일부 양태에서, R^2 및 R^3 은 각각 독립적으로 수소 및 C_1 - C_6 알킬로부터 선택된다. 일부 양태에서, R^2 및 R^3 은 각각 독립적으로 수소, 메틸 및 에틸로부터 선택된다. 일부 양태에서, R^2 및 R^3 은 각각 수소이다.

[0081] 일부 양태에서, 화학식 (I)의 화합물은



또는 이의 약제학적으로 허용되는 염이며, 여기서, R^8 은 -OH, -CN, 할로젠, 또는 C_1 - C_6 알킬로부터 선택된다.



[0082] 일부 양태에서, 화학식 (I)의 화합물은 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염이다.

[0083] 일부 양태에서, 약제학적으로 허용되는 염은 타르트레이트 염, 메실레이트 염, 또는 포스페이트 염이다. 일부 양태에서, 약제학적으로 허용되는 염은 타르트레이트 염이다. 일부 양태에서, 타르트레이트 염은 L-타르트레이트 염이다.

[0084] 일부 양태에서, 화합물은 피험자에 대하여 경구 투여용으로 제형화된다.

[0085] 일부 양태에서, HHT의 치료는 HHT 관련된 출혈의 빈도, 기간 또는 세기의 감소를 포함한다. 이러한 일부 양태에서, HHT 관련된 출혈은 위장관(GI) 출혈이다. 일부 양태에서, HHT 관련된 출혈은 코피이다.

[0086] 일부 양태에서, HHT의 치료는 피험자에서의 헤모글로빈 수치 증가를 포함한다.

[0087] 일부 양태에서, HHT의 치료는 피험자에서의 모세혈관확장증의 개수의 감소를 포함한다. 일부 양태에서, HHT의 치료는 피험자에서의 모세혈관확장증의 크기의 감소를 포함한다. 일부 양태에서, 모세혈관확장증은 피부 모세혈관확장증이다. 일부 양태에서, 모세혈관확장증은 비강 모세혈관확장증이다. 일부 양태에서, 모세혈관확장증은 경구 모세혈관확장증이다. 일부 양태에서, 모세혈관확장증은 위장관 모세혈관확장증이다.

[0088] 일부 양태에서, HHT의 치료는 피험자에서의 동정맥 기형증(AVM)의 개수의 감소를 포함한다. 일부 양태에서, HHT의 치료는 피험자에서의 동정맥 기형증(AVM)의 크기의 감소를 포함한다. 일부 양태에서, HHT의 치료는 피험자에

서의 AVM 형성의 방지를 포함한다. 이러한 일부 양태에서, 동정맥 기형증은 폐 AVM이다. 일부 양태에서, 동정맥 기형증은 대뇌 (뇌) AVM이다. 일부 양태에서, 동정맥 기형증은 내장 AVM이다.

- [0089] 일부 양태에서, HHT의 치료는 심부전증 및 폐동맥 고혈압(PAH)의 감소를 포함한다. 일부 양태에서, HHT의 치료는 심부전증 및 폐동맥 고혈압(PAH)의 예방을 포함한다.
- [0090] 일부 양태에서, HHT의 치료는 피험자에서 폐 AVM에 의해 유발된 좌우 선트의 예방을 포함한다. 일부 양태에서, HHT의 치료는 피험자에서 폐 AVM에 의해 유발된 좌우 선트의 등급의 감소를 포함한다.
- [0091] 일부 양태에서, HHT의 치료는 피험자에서 철분 보충의 필요성의 감소, 예를 들면 피험자에 의해 요구되는 철분 주입 횟수의 감소를 포함한다. 일부 양태에서, HHT의 치료는 피험자에서 요구되는 수혈의 횟수의 감소를 포함한다.
- [0092] 일부 양태에서, HHT의 치료는 간 혈류의 저하를 포함한다.
- [0093] 일부 양태에서, HHT의 치료는 피험자에서의 간 이식의 필요성을 감소시킨다.
- [0094] 일부 양태에서, HHT의 치료는 HHT의 추가 증상의 빈도 및/또는 중증도의 감소를 포함한다. 이러한 추가 증상은 호흡곤란, 편두통, 피로, 신경학적 사례, 및 색전증 사례를 포함할 수 있다.
- [0095] 또한 본 발명은, 전술된 양태 중 어느 것에 정의된 바와 같은 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 유전성 출혈성 모세혈관확장증(HHT)의 치료를 필요로 하는 피험자에게 유효량으로 투여함을 포함하는, 상기 피험자의 유전성 출혈성 모세혈관확장증(HHT)을 치료하는 방법을 제공한다.
- [0096] 일부 양태에서, HHT의 치료 방법은 HHT 관련된 출혈의 빈도, 기간 또는 세기의 감소를 초래한다. 이러한 일부 양태에서, HHT 관련된 출혈은 위장관(GI) 출혈이다. 일부 양태에서, HHT 관련된 출혈은 코피이다.
- [0097] 일부 양태에서, HHT의 치료 방법은 피험자에서의 헤모글로빈 수치에 증가를 초래한다.
- [0098] 일부 양태에서, HHT의 치료 방법은 피험자에서의 모세혈관확장증의 개수의 감소를 초래한다. 일부 양태에서, HHT의 치료 방법은 피험자에서의 모세혈관확장증의 크기의 감소를 초래한다. 일부 양태에서, 모세혈관확장증은 피부 모세혈관확장증이다. 일부 양태에서, 모세혈관확장증은 비강 모세혈관확장증이다. 일부 양태에서, 모세혈관확장증은 경구 모세혈관확장증이다. 일부 양태에서, 모세혈관확장증은 위장관 모세혈관확장증이다.
- [0099] 일부 양태에서, HHT의 치료 방법은 피험자에서의 동정맥 기형증(AVM)의 개수의 감소를 초래한다. 일부 양태에서, HHT의 치료 방법은 피험자에서의 동정맥 기형증(AVM)의 크기의 감소를 초래한다. 일부 양태에서, 상기 방법은 피험자에서의 AVM 형성을 방지한다. 이러한 일부 양태에서, 동정맥 기형증은 폐 AVM이다. 일부 양태에서, 동정맥 기형증은 뇌 AVM이다. 일부 양태에서, 동정맥 기형증은 내장 AVM이다.
- [0100] 일부 양태에서, HHT의 치료 방법은 피험자의 삶의 질의 개선을 초래한다.
- [0101] 일부 양태에서, HHT의 치료 방법은 심부전증 및 폐동맥 고혈압(PAH)의 감소를 초래한다. 일부 양태에서, HHT의 치료 방법은 심부전증 및 폐동맥 고혈압(PAH)의 예방을 초래한다.
- [0102] 일부 양태에서, HHT의 치료 방법은 피험자에서 폐 AVM에 의해 유발된 좌우 선트를 예방한다. 일부 양태에서, HHT의 치료 방법은 피험자에서 폐 AVM에 의해 유발된 좌우 선트의 등급의 감소를 초래한다.
- [0103] 일부 양태에서, HHT의 치료 방법은 피험자에서 철분 보충의 필요성의 감소, 예를 들면 피험자에 의해 요구되는 철분 주입 횟수의 감소를 초래한다. 일부 양태에서, HHT의 치료 방법은 피험자에서 요구되는 수혈의 횟수의 감소를 초래한다.
- [0104] 일부 양태에서, HHT의 치료 방법은 간 혈류의 저하를 초래한다.
- [0105] 일부 양태에서, HHT의 치료 방법은 피험자에서의 간 이식의 필요성을 감소시킨다.
- [0106] 일부 양태에서, HHT의 치료 방법은 HHT의 추가 증상의 빈도 및/또는 중증도의 감소를 초래한다. 이러한 추가 증상은 호흡곤란, 편두통, 피로, 신경학적 사례, 및 색전증 사례를 포함할 수 있다.
- [0107] 일부 양태에서, HHT의 치료 방법은 피험자의 삶의 질의 전반적인 개선을 초래한다.
- [0108] **정의 및 약어**
- [0109] 본원에서 사용되는 용어 "알로스테릭 AKT 저해제"는 효소의 활성 부위 이외의 부위에서 AKT에 결합하여 AKT의

활성을 저해하는 물질을 의미한다.

[0110] 본원에서 사용되는 용어 "할로겐"은 -F, -Cl, -Br 및 -I를 지칭한다.

[0111] 약어:

표 1

표 1: 약어

HHT	유전성 출혈성 모세혈관확장증
AVM	동정맥 기형증
AV	동정맥
Eng-iKO	엔도글린-유도 녹아웃
ALK1 (ACVRL1 이라고도 함)	액티빈(Activin) 수용체-유사 키나아제 1
BMP	골 형태발생 단백질
TGF-β	형질전환 성장 인자-β
VEGF	혈관 내피 성장 인자
PI3K	포스포이노시티드 3-키나아제
AKT	단백질 키나아제 B (PKB 라고도 함)
PTEN	포스파타아제 및 텐신 동족체
mTOR	라파마이신의 포유류 표적 (Mammalian target of rapamycin)
eNOS	내피 산화질소 합성 효소 (Endothelial nitric oxide synthase)
Ang2	안지오게닌 2
FOXO	포크헤드 박스 단백질 (Forkhead box protein) (O 등급)
iKO	유도 녹아웃
IP 주사	복강내 주사
PFA	파라포름알데히드
PBS	인산염-완충 식염수
BSA	소 혈청 알부민
α-SMA	알파 평활근 액틴
FITC	플루오레세인 이소티오시아네이트
ANOVA	분산분석
SEM	평균의 표준오차

[0112]

ATP	아데노신 트리포스페이트
PKA	단백질 키나아제 A
PKC	단백질 키나아제 C
PKG	단백질 키나아제 G
PRKACA	단백질 키나아제 촉매 소단위체 알파
PRKACB	단백질 키나아제 촉매 소단위체 베타
cGMP	사이클릭 구아노신 모노포스페이트
PRKG1	단백질 키나아제 CGMP-의존성 1
ROCK	Rho-관련 단백질 키나아제
Px	출생후 x 일
Q.D.	매일(<i>quaque die</i>) (즉, 1 일 1 회)

[0113]

[0114]

실시예

[0115]

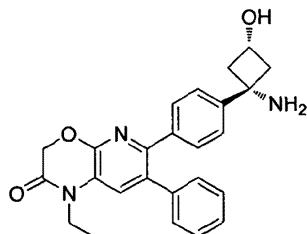
실시예 1: 6-(4-(1-아미노-3-하이드록시사이클로부틸)페닐)-1-에틸-7-페닐-1H-피리도[2,3-b][1,4]옥사진-2(3H)-온의 합성

[0116]

6-(4-(1-아미노-3-하이드록시사이클로부틸)페닐)-1-에틸-7-페닐-1H-피리도[2,3-b][1,4]옥사진-2(3H)-온 ("VAD044 유리 염기"이라고도 함)을 WO 2011077098, 특히 실시예 97, 113 및 139(하기 재현됨)에 제시된 프로토콜에 따라 합성하였다:

[0117]

6-(4-((1s,3s)-1-아미노-3-하이드록시사이클로부틸)페닐)-1-에틸-7-페닐-1H-피리도[2,3-b][1,4]옥사진-2(3H)-온의 합성: WO 2011077098 실시예 139로부터:



[0118]

[0119]

1단계: tert-부틸((1s,3s)-1-(4-(1-에틸-2-옥소-7-페닐-2,3-디하이드로-1H-피리도[2,3-b][1,4]옥사진-6-일)페닐)-3-하이드록시사이클로부틸)카바메이트

[0120]

15mL 반응 튜브에 1,4-디옥산 (2.3mL)과 물 (0.8mL)의 혼합물 중의 6-브로모-1-에틸-7-페닐-1H-피리도[2,3-b][1,4]옥사진-2(3H)-온* (50mg, 0.150mmol), tert-부틸((1s,3s)-3-하이드록시-1-(4-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)페닐)사이클로부틸)카바메이트** (49mg, 0.125mmol) 및 탄산세슘 (204mg, 0.625mmol)를 첨가하여 무색 용액을 제공하였다. 이를 15분 동안 질소 버블링에 의해 탈기시키고, 이어서 [1,1'-비스(디페닐포스포노)페로센]디클로로팔라듐(II) 디클로로메탄 부가물 (20mg, 0.025mmol)을 첨가하고 추가로 5분 동안 탈기시켰다. 반응 혼합물을 질소 분위기하에 1시간 동안 50°C로 가열한 다음 실온으로 냉각시키고 물 (5mL)로 희석하고 에틸 아세테이트 (3×5mL)로 추출하였다. 합한 유기 층을 Na₂SO₄로 건조시키고, 여과하고 감압하에 농축 건조시켰다. 잔류물을 Biotage 크로마토그래피 (사이클로헥산:에틸 아세테이트, 90:10으로부터 0:100으로의 구배 용리)로 정제하여 목적하는 생성물을 오프화이트색 고체로 제공하였다 (45mg, 70% 수율). ¹H-NMR (500MHz, CDCl₃) δ 7.29-7.35 (5H, m), 7.28 (1H, s), 7.18-7.24 (4H, m), 4.96 (1H, br s), 4.88 (2H, s), 4.05 (1H, br s), 4.01 (2H, q), 2.98 (2H, br s), 2.75 (2H, br s), 1.20-1.51 (9H, br m), 1.32 (3H, t). LCMS (방법 D) RT = 1.25분, M+H⁺ = 516.20.

- [0121] 2단계: 6-(4-((1s,3s)-1-아미노-3-하이드록시사이클로부틸)페닐)-1-에틸-7-페닐-1H-피리도[2,3-b][1,4]옥사진-2(3H)-온
- [0122] *tert*-부틸((1s,3s)-1-(4-(1-에틸-2-옥소-7-페닐-2,3-디하이드로-1H-피리도[2,3-b][1,4]옥사진-6-일)페닐)-3-하이드록시사이클로부틸)카바메이트 (45mg, 0.087mmol)를 TFA (1mL)에 용해시키고 30초 동안 교반하였다. 용액을 즉시 감압하에 농축 건조시켰다. 잔류물을 디에틸 에테르 (~3mL)에 용해시키고 감압하에 3회 농축 건조시켰다. 이어서 잔류물을 디에틸 에테르 (3mL)에 슬러리화하고 침전 후 상등액 용매를 피펫으로 제거하였다. 이를 3회 반복하였다. 잔여 용매를 밤새 동결건조에 의해 제거하여 목적하는 화합물을 오프화이트색 고체로 제공하였다 (33mg, 71% 수율). ¹H-NMR (500MHz, MeOD) δ 7.55 (1H, s), 7.39-7.42 (4H, m), 7.27-7.31 (3H, m), 7.20-7.24 (2H, m), 4.93 (2H, s), 4.01-4.11 (3H, m), 3.03-3.1 1 (2H, m), 2.42-2.50 (2H, m), 1.28 (3H, t). LCMS (방법 D) RT = 0.74분, M+H⁺ = 416.20.
- [0123] * 6-브로모-1-에틸-7-페닐-1H-피리도[2,3-b][1,4]옥사진-2(3H)-온의 합성: WO 2011077098 실시예 113(1단계 내지 4단계) 및 222페이지(5단계)로부터:
- [0124] 1단계: 에틸 2-((5-브로모-3-니트로피리딘-2-일)옥시)아세테이트
- [0125] 1,4-디옥산 (250mL) 중의 수소화나트륨 (5.31g, 133mmol)의 현탁액에, 에틸 글리콜레이트 (12.56 ml, 133mmol)를 30분에 걸쳐 적가하여 온도가 30℃ 미만으로 유지되도록 하였다. 생성된 농후 현탁액을 실온에서 15분 동안 교반하였다. 별도의 1L 환저 플라스크에 1,4-디옥산 (150ml) 중의 5-브로모-2-클로로-3-니트로피리딘 (21g, 88mmol)을 첨가하여 갈색 용액을 제공하였다. 수소화나트륨과 에틸 글리콜레이트의 현탁액을 0℃에서 30분에 걸쳐 적가하였다. 생성된 반응 혼합물을 밤새 80℃로 가열하였다.
- [0126] 반응 혼합물을 감압하에 농축하고 조악한 잔류물을 Biotage 실리카 크로마토그래피 (구배 0%로부터 10%로의 n-헥산 중의 에틸 아세테이트)로 정제하여 표제 화합물 (1.8g, 44%)을 제공하였다. ¹H NMR (500MHz, CDCl₃) δ 8.48 (1H, s), 8.42 (1H, s), 5.07 (2H, s), 4.28-4.24 (2H, q), 1.31-1.28 (3H, t).
- [0127] 2단계: 에틸 2-((3-니트로-5-페닐피리딘-2-일)옥시)아세테이트
- [0128] 1L 환저 플라스크에 1,2-디메톡시에탄 (300mL) 중의 에틸 2-(5-브로모-3-니트로피리딘-2-일옥시)아세테이트 (18.33g, 60.1mmol), 페닐보론산 (10.99g, 90mmol), 트리페닐포스핀 (4.73g, 18.02mmol) 및 플루오로화세슘 (45.6g, 300mmol)을 첨가하여 황색 용액을 제공하였다. 반응 혼합물을 30분 동안 질소 버블링에 의해 탈기시켰다. 팔라듐(II) 아세테이트 (2.023g, 9.01mmol)를 첨가하고 혼합물을 질소 분위기하에 밤새 75℃로 가열하였다. 반응 혼합물을 실온으로 냉각시키고 감압하에 농축 건조시켜 갈색 고체를 제공하였다. 이를 디클로로메탄에 재용해시키고, 여과하고 감압하에 농축 건조시켜 갈색 고체를 제공하였다. 조악한 잔류물을 Biotage 크로마토그래피 (구배 5%로부터 60%로의 n-헥산 중의 에틸 아세테이트)로 정제하여 표제 화합물 (6.9g, 38%). ¹H NMR (500MHz, CDCl₃) δ 8.58 (1H, s), 8.56 (1H, s), 7.59-7.52 (2H, m), 7.48-7.46 (2H, m), 7.45-7.43 (1H, m), 5.13 (2H, s), 4.30-4.26 (2H, q), 1.33-1.30 (3H, t).
- [0129] 3단계: 7-페닐-1H-피리도[2,3-b][1,4]옥사진-2(3H)-온
- [0130] 500mL 환저 플라스크에 37% 염산 (40mL) 중의 에틸 2-(3-니트로-5-페닐피리딘-2-일옥시)아세테이트 (4.6g, 15.22mmol)를 첨가하여 황색 현탁액을 제공하였다. 혼합물을 0 내지 5℃로 냉각시킨 다음 주석 분말(9.94g, 84mmol)을 분획씩 첨가하였다. 첨가물은 발열성인 것으로 판명되었다. 조심스럽게 첨가하였다. 이어서 모든 발포(foaming)가 멈출 때까지 혼합물을 실온에서 추가 30분 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 질소 분위기하에 3시간 동안 80℃로 가열하였다. 반응 혼합물을 실온으로 냉각시키고 물 (800ml)로 희석하였다. 백색 침전물을 여과에 의해 단리하고, 물 (100ml)로 세척하고, 흡인하여 건조시켜 백색 고체를 제공하였다. 고체를 톨루엔 (3×30mL)으로 공비혼합하여 백색 고체를 표제 화합물로 제공하였다 (2.6g, 77%). ¹H NMR (500MHz, (CD₃)₂SO) δ 10.41 (1H, s), 8.10 (1H, s), 7.59 (2H, d), 7.49-7.42 (2H, t), 7.39-7.38 (1H, d), 4.83 (2H, s).
- [0131] 4단계: 6-브로모-7-페닐-1H-피리도[2,3-b][1,4]옥사진-2(3H)-온
- [0132] 10ml 마이크로파 바이알에 (added) 디메틸포름아미드 (1mL) 중의 7-페닐-1 H-피리도[2,3-b][1,4]옥사진-2(3H)-온 (50mg, 0.221mmol) 및 N-브로모석신아미드 (78.6mg, 0.441mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 마이크로파

조사하에 30분 동안 80℃로 가열하였다. 반응 혼합물을 실온으로 냉각시키고 에틸 아세테이트 (10mL)로 희석하였다. 유기 용액을 물 (2×10mL)과 염수 (2×10mL)로 세척하였다. 유기 층을 무수 Na₂SO₄로 건조시키고, 여과하고 감압하에 농축하였다. 조악한 잔류물을 Biotage 크로마토그래피 (구배 0%로부터 5%로의 디클로로메탄 중의 메탄올)로 정제하여 표제 화합물을 황색 고체로 정제하였다 (61mg, 90%). ¹H NMR (500MHz, CD₃OD) δ 7.48-7.32 (5H, m), 7.12 (1H, s), 4.82 (2H, s).

[0133] 5단계: 6-브로모-1-에틸-7-페닐-1H-피리도[2,3-b][1,4]옥사진-2(3H)-온

[0134] 15mL 반응 튜브에 무수 N,N-디메틸포름아미드 (1mL) 중의 6-브로모-7-페닐-1H-피리도[2,3-b][1,4]옥사진-2(3H)-온 (300mg, 0.983mmol), 요오도에탄 (0.095mL, 1.180mmol) 및 탄산칼륨 (408mg, 2.95mmol)을 첨가하여 갈색 현탁액을 제공하였다. 이를 50℃에서 질소 분위기하에 60분 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 중탄산나트륨 포화용액 (5mL)으로 희석하고 에틸 아세테이트 (3×5mL)로 추출하였다. 합한 유기 층을 50:50 물:염수 (3×5mL)로 세척하고, Na₂SO₄로 건조시키고, 여과하고 감압하에 농축 건조시켜 갈색 고체를 제공하였다. 이를 Biotage 크로마토그래피 (25g 실리카 카트리지, 사이클로헥산:에틸 아세테이트, 90:10으로부터 20:80으로의 구배 용리)로 정제하여 표제 화합물을 베이지색 고체로 제공하였다 (160mg, 48.8 % 수율). ¹H NMR (500MHz, CDCl₃) δ 7.58-7.37 (5H, m), 7.21 (1H, s), 4.86 (2H, s), 3.96 (2H, q), 1.27 (3H, t). LCMS (방법 D) RT 1.293분, M+1= 334.

[0135] ** tert-부틸((1s,3s)-3-하이드록시-1-(4-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)페닐)사이클로부틸)카바메이트의 합성 (WO 2011077098 실시예 97로부터):

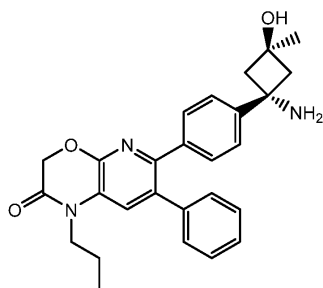
[0136] 40mL 반응 튜브에 무수 테트라하이드로푸란 (14mL) 중의 tert-부틸(1s,3s)-1-(4-브로모페닐)-3-하이드록시사이클로부틸카바메이트*** (0.25g, 0.731mmol)를 첨가하여 무색 용액을 제공하였다. 이를 20분 동안 질소로 버블링 함으로써 탈기시킨 후 [1,1'-비스(디페닐포스포노)페로센]디클로로팔라듐(II) 디클로로메탄 부가물 (60mg, 0.073mmol)을 첨가하였다. 추가 15분 동안 질소로 버블링한 후, 칼륨 아세테이트 (143mg, 1.461mmol) 및 비스(피나콜레이트)디보론 (223mg, 0.877mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 밤새 환류 가열하였으며 이어서 감압하에 농축 건조시키고 Biotage 크로마토그래피 (사이클로헥산:에틸 아세테이트, 88:12로부터 0:100으로의 구배 용리)로 정제하여 목적하는 생성물을 무색 오일로 제공하였으며, 이는 방치시 고화되었다 (240mg, 84% 수율). ¹H-NMR (500MHz, CDCl₃) δ 7.71 (2H, d), 7.44 (2H, d), 4.15 (1H, br s), 2.87-2.98 (2H, m), 2.27-2.44 (2H, m), 1.22-1.49 (21H, br m).

[0137] (***) WO 2009148887 및 WO 2009148916에 개시된 합성)

[0138] 실시예 2: 시험관내 약력학

[0139] 6-(4-(1-아미노-3-하이드록시사이클로부틸)페닐)-1-에틸-7-페닐-1H-피리도[2,3-b][1,4]옥사진-2(3H)-온 L-타르 트레이트 (VAD044)를 생화학적 키나아제 분석에서 전장 AKT1 및 AKT2의 활성을 강력하고 선택적으로 저해하는 것으로 밝혀졌으며 IC₅₀ 값은 (AKT3에 대한 > 500nM과 비교) 각각 125nM 및 95nM이다. 그러나, 불활성 플렉스트린 상동성(pleckstrin homology)(PH) 도메인을 함유하는 3개 AKT 이소형(isoform) 모두의 돌연변이 형태는 VAD044에 의해 저해되지 않았다. 또한, 증가하는 농도의 ATP를 갖는 VAD044를 항온배양하는 것은 ATP에 대해 K_m에서 수행된 실험과 비교할 때 IC₅₀ 값에 영향을 끼치지 않았다. 이는, VAD044에 대한 결합 방식이 알로스테릭이고 ATP 농도와 무관함을 확인시킨다.

[0140] VAD044의 가정된 알로스테릭 결합 모드는, AKT2와의 복합에서 VAD044 유리 염기 (하기 화합물 6)의 인접한 유사체로 얻은 고해상도(2.32Å) 공결정 구조를 통해 확인되었다(도 1a 참조).



화합물 6

[0141]

[0142]

도 1b에 도시된 바와 같이, 화합물 6은, 키나아제 도메인과 PH 도메인의 N- 및 C-로브(lobe)의 경계면에서 힌지 영역으로부터 약 10Å 떨어진 알로스테릭 결합 포켓에 결합한다.

[0143]

실시예 3: 키나아제 선택성, 및 수용체 및 이온 채널 프로파일

[0144]

VAD044는 AKT1 및 AKT2의 강력한 알로스테릭 저해제이다. 관련 없는 단백질 키나아제, G 단백질 결합 수용체 및 이온 채널을 표적으로 하는 VAD044의 선택성 범주(selectivity window)를 시험하였다. 우수한 선택성 범주는 환자에게 효능이 있을 것으로 예상되는 약리학적 농도에서 유리한 안전성 프로파일을 제시한다.

[0145]

키나아제 선택성

[0146]

VAD044는, 450개 키나아제 패널에 대해 시험할 때 10 μM에서 AKT1 및 AKT2에 대해 매우 선택적인 것으로 나타났다(도 2b에 표시된 바와 같이 AKT1의 89% 저해 및 AKT2의 95% 저해 달성). 특히, p38 α 및 PDK1 (각각 84% 및 77% 저해, 도 2b에도 표시됨)의 두 가지 다른 키나아제에서만 75% 이상의 저해가 달성되었다. AKT3의 72%만 저해되었다(도 2b 참조).

[0147]

10개 지점 적정 곡선을 통한 추가 분석을 통해 p38 α 및 PDK1의 IC₅₀이 10 μM을 초과하였음을 확인하였다.

[0148]

또한, VAD044에 대한 IC₅₀ 값은 AKT3 이소형 (이에 대한 VAD044의 EC₅₀ 값은 500nM을 초과하였다)에 대한 것보다 AKT1 및 AKT2 (각각 IC₅₀ = 125nM 및 IC₅₀ = 95nM)에서 훨씬 낮은 것으로 밝혀졌다.

[0149]

따라서 상기 결과는 VAD044가 AKT1 및 AKT2의 강력하고 선택적인 저해제임을 입증한다.

[0150]

수용체 및 이온 채널 프로파일

[0151]

10 μM에서 시험할 때, VAD044는 심장 이온 채널 Nav1.5, Cav1.2, Kv4.3, KChIP2, Kv1.5, KCNQ1, minK, Kir2.1 및 HCN4를 이의 활성의 25% 미만으로 저해하지 않았으며 76개의 수용체 및 이온 채널 패널(밀리포어 트릭 디스커버리 안전성 및 책임 패널)의 뛰어난 선택성을 나타내었다. 특히, 3개 G 단백질-결합 수용체(G protein-coupled receptor)(GPCR)만이 10 μM에서 50% 이상의 저해를 나타내었으며 (즉, LPA1, 모틸린(Motilin), 및 P2Y1 수용체 (각각 57.4%, 50.0% 및 50.6%의 평균 저해 백분율 값을 나타냄)) 하나의 GPCR만이 GPCR 활성이 20% 이상 증가하는 효능제 활성을 나타내었다 (즉, GPR14, 10 μM에서 29.5%의 증가가 관찰됨). 이러한 결과는 표 2에 나와 있다.

표 2

표 2: 밀리포어 드럭 디스커버리 안전성 및 책임 패널의 결과

GPCR 표적	효능제 평균 활성 증가율 (%)	길항제 평균 저해율 (%)	GPCR 표적	효능제 평균 활성 증가율 (%)	길항제 평균 저해율 (%)
5-HT1A	2.1	30.6	GnRH	-0.6	4
5-HT2A	1.3	-0.7	GPR109A	-0.7	3.1
5-HT2B	3.7	7.6	GPR14	29.5	52.9
5-HT2C	0.8	21.9	H1	-0.2	3.8
A1	0	7.7	H2	-0.2	-1.8
A2A	2.3	12.5	H3	-0.6	3.5
A3	0.2	28.5	IP1	1.1	-2.6
ADRA1A	-0.7	9.9	LPA1	-1.3	57.4
ADRA1D (DELTA2-79)	-0.1	7	LPA3	-0.7	-0.2
ADRA2A	-0.2	11.8	M1	-0.7	-3.4
ADRB1	-0.1	4.2	M2	0	20.6
ADRB2	0.8	6.1	M3	-0.5	5.3
AT1	-0.1	5.4	MC5	-0.2	8.4
BB2	-0.9	0.9	모틸린	-0.3	50
BDKR2	-0.4	14.6	NK1	-1.4	2.4
BLT1	-0.2	5.6	NK3	-0.4	16.9
C5aR	-1.2	1.5	NMU1	-3.1	5.5
CB1	-0.5	-4.1	NTR1	-0.6	6.1
CB2	-0.9	10.6	OPRD1	-0.9	2.8
CCK2	-0.2	8.3	OPRM1	-2	2.4
CCR1	0.2	9.5	OT	-1.2	29.5
CCR2B	-0.1	9.1	OX1	-1.8	-3.8
CGRP1	-0.1	-7.9	P2Y1	1	50.6
CRF1	0	2.3	PAC1	-0.6	1.1
CX3CR1	0	0.6	PAF	-0.9	21
CXCR1	-0.3	3.7	PK1	0	-2.1
CysLT1	-0.8	1.5	PRP	-0.5	23.2
D1	1.5	18.7	PTH1	-1.1	-2.5
D2	-1.1	-0.2	S1P3	-0.4	-0.6
D5	-0.8	35.4	SST4	-0.8	16.5
DP	-1.7	5.8	트롬빈- 활성화 PAR	0	-1.2
EP2	-1	-0.5	TP	-0.5	0
EP3	-0.1	9.2	TSH	-0.1	-0.5
ETA	-0.4	10.5	V1A	-1.5	2.5
ETB	-1.1	2.9	V2	-1.5	22.8
FP	-0.7	13.6	VPAC1	-0.7	8.5
FPR1	-0.1	13.3	VPAC2	0	6.2
GAL1	0.3	3.4	Y2	-2.2	-5.7

[0152]

[0153] 상기 결과는 VAD044가 시험된 수용체 및 이온 채널을 방해하지 않음을 입증한다.

[0154] 따라서 VAD044의 시험관내 효소 프로파일은 다음과 같이 요약할 수 있다:

[0155] - VAD044는 AKT3 이소형 (IC50 > 500nM)에 비해 최소 5배의 범위로 AKT1 및 AKT2 (IC50 = 125nM 및 95nM)를 강력하게 선택적으로 저해한다.

[0156] - VAD044는 시험된 키나아제, 수용체 및 이온 채널의 광범위한 패널을 방해하지 않는다.

[0157] 실시예 4: 안전성/독성; 항혈관신생 특성; 및 3개 AKT 저해제 화합물의 Eng-iKO 마우스에서의 AVM 형성 방지 능력의 연구

[0158] 재료/방법

[0159] 마우스

[0160] C57B1/6J 임신 암컷은 Janvier Labs. *EngFlox/flox* 마우스에서 제공되었고 (Mahmoud et al., (2010), "Pathogenesis of arteriovenous malformations in the absence of endoglin", Circulation Research. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.211037>) *Cdh5(PAC)-CreERT2*와 교배하여 (12) 내피 특정 유도 *Eng* 녹

아웃을 생성한다. 동물 사육 및 절차는 네덜란드 정부 지침 및 유럽 의회의 지침 2010/63/EU에 따랐다. 사용되는 동물의 수와 이들의 고통을 최소화하기 위해 모든 노력을 기울였다. 라이덴 대학 의료 센터(프로젝트 번호 AVD1160020171628)의 동물 복지 위원회는 모든 프로토콜을 승인하였다. 수컷 및 암컷 마우스를 출생 후 첫 주 동안 사용하여 망막 혈관신생을 연구하였다.

[0161] 생체내 AKT 저해

[0162] 혈관신생을 저해하는 최소 유효 용량의 안전성/독성 프로파일 및 식별:

[0163] 야생형 C57B1/6J 새끼에게 P4에서 5, 10, 25, 50 또는 100mg.kg⁻¹ 체중의 페리포신 또는 0, 2.5, 5, 10, 25 또는 50mg.kg⁻¹ 체중의 우프로셀팁 또는 2.5, 5 및 10mg.kg⁻¹의 VAD044를 1회 주사하고 이어서 P7에서 사멸시켰다. 문헌(Lebrin et al., (2010), "Thalidomide stimulates vessel maturation and reduces epistaxis in individuals with hereditary hemorrhagic telangiectasia", Nature Medicine. <https://doi.org/10.1038/nm.2131>)에 개시된 바와 같이 면역형광법 염색을 위해 망막을 처리하였다.

[0164] Eng-iKO 마우스에서 AVM 형성을 방지하는 최소 유효 용량의 식별:

[0165] EngFlox/flox; cdh5-CreERT2에게 P2에서 타목시펜(50μg)을 주사하여 신생아 마우스에서 거의 완전한 유전자 녹아웃을 유발시키고 이어서 0, 25 또는 50mg.kg⁻¹ 체중의 페리포신을 P3 및 P5에서 1회 IP 주사하거나 10mg.kg⁻¹ 체중의 페리포신을 P3, P4, P5 및 P6에서 1회 IP 주사하였다. 동일한 체적의 비히클을 대조군 동물에게 주사하였다. 이어서 마우스를 P7에서 안락사시키고 문헌(Lebrin et al., 상기와 같음)에 개시된 바와 같이 면역형광법 염색을 위해 망막을 처리하였다.

[0166] EngFlox/flox; cdh5-CreERT2에게 P2에서 타목시펜(50mg)을 주사하여 신생아 마우스에서 거의 완전한 유전자 녹아웃을 유발시키고 0, 1, 2.5 또는 5mg.kg⁻¹ 체중의 우프로셀팁을 P3에서 1회 IP 주사하였다. 동일한 체적의 비히클을 대조군 동물에게 주사하였다. 이어서 마우스를 P7에서 안락사시키고 문헌(Lebrin et al., 상기와 같음)에 개시된 바와 같이 면역형광법 염색을 위해 망막을 처리하였다.

[0167] EngFlox/flox; cdh5-CreERT2에게 P2에서 타목시펜(50mg)을 주사하여 신생아 마우스에서 거의 완전한 유전자 녹아웃을 유발시키고 0, 2.5, 5 또는 10mg.kg⁻¹ 체중의 VAD044를 P3 및 P5에서 1회 IP 주사하였다. 동일한 체적의 비히클을 대조군 동물에게 주사하였다. 이어서 마우스를 P7에서 안락사시키고 문헌(Lebrin et al., 상기와 같음)에 개시된 바와 같이 면역형광법 염색을 위해 망막을 처리하였다.

[0168] 망막 혈관망 분석

[0169] 망막 혈관 네트워크에 있어서 마우스당 AV 섀트 수의 정량화를 수동으로 수행하였다. 문헌(Lebrin et al., (2010), "Thalidomide stimulates vessel maturation and reduces epistaxis in individuals with hereditary hemorrhagic telangiectasia", Nature Med, 16(4), 420-8; Gkatzis et al., (2016), "Interaction Between ALK1 Signaling and Connexin40 in the Development of Arteriovenous Malformations", Arterioscler Thromb Vasc Biol., 36(4), 707-17; and Thalgott et al., (2018), "Decreased Expression of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1 Contributes to the Pathogenesis of Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia Type 2", Circulation, 138(23), 2698- 2712)에 개시된 바와 같이, 시신경으로부터의 방사형 확장, 혈관 길이 및 분기점을 ImageJ 소프트웨어(미국 국립 보건원)를 사용하여 망막당 최소 4개 필드에서 분석하였다. 맞춤형 자체 실험실 제작 매크로는, 동일한 처리 및 정량화 매개변수를 사용하여 이미지의 자동 처리를 허용하였다. 간단하게는, 이미지의 밝기는, 특정 이미지 히스토그램 컨텐트에 따라 달라지는 픽셀 극단 값을 수정하여 향상되었다. 균질성의 세기를 저하시키기 위해 가우시안 필터를 적용하였다. 상기 필터 순서는 이미지 해상도에 따라 다르다. 이어서, Otsu의 방법이나 Li의 방법과 같은 전역 임계값 기법을 기반으로 임계값 단계를 계산하여, 이진 이미지(binary image)를 생성하였다. 이어서, 잘못된 분기점 감지를 유발할 수 있는 잠재적인 국부적 불규칙성을 제거하기 위해 중앙 값 필터를 적용하였다. 이진 이미지로부터, 혈관 밀도를 정량화하였다 (혈관과 관련된 픽셀의 비율을 이미지의 총 픽셀 수로 나눈 값으로 계산하였다). 다른 매개변수의 경우, 먼저 ImageJ를 사용하여 이미지의 골격을 계산한 다음, ImageJ로부터의 Measure Skeleton Length 플러그-인을 사용하여 혈관 총 길이를 정량화하였다. Microsoft Office Excel 소프트웨어로 전송하였으며 실험실 맞춤형 프로그램을 사용하여 자동 재정렬하였다. 각 처리 단계에서 생성된 모든 이미지를 저장하였으며 비정상적인 결과가 발생하지 않도록 시각적으로 제어하였다.

- [0170] Prism 7 소프트웨어(GraphPad)로 통계 분석을 수행하였다. 대부분의 실험에서 다중 비교를 위해 1원 ANOVA를 사용하였다. 결과는 평균 $\pm$ SEM으로 표현한다. post hoc pairwise의 경우 더넷(Dunnett) 시험을 사용하였다. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 또는 **** $P < 0.0001$ 의 값은 통계적 유의성을 나타낸다. 혈관 구조 변화와 관련된 매개변수에서 약 15%의 군 내 변동이 본 발명자들에 의해 이전에 관찰되었으며, 따라서 약 20 내지 30%의 대조군과 돌연변이 마우스 사이의 차이가 예상되었다. 따라서 조건당 8마리 마우스 군이 통계적 차이를 나타낼 것으로 예상되었다.
- [0171] *마우스 내피 세포 분리, 배양 및 자극*
- [0172] Engflox/flox 새끼로부터의 폐를 외과적으로 제거하여 빙냉 DMEM으로 세정하고 내피 세포를 문헌(Galaris et al., (2021) "*In vitro* Three-Dimensional Sprouting Assay of Angiogenesis using Mouse Embryonic Stem Cells for Vascular Disease Modeling and Drug Testing" *J Vis Exp* (171))에 개시된 바와 같이 분리시켰다. 요약하면, 조직을 가위로 잘게 자르고 DMEM-3mg.ml⁻¹ Collagenase A(10103586001, Roche)에서 37℃에서 15분 동안 소화시킨(digested) 다음 70 μ m 스트레이너(strainer)를 통해 여과하였다. T 세포 현탁액을 200g에서 5분 동안 원심분리하고 CD45⁺ 세포를, 랫트 항-마우스 CD45 항체(550539, BD Pharmingen)로 코팅된 Dynabeads 양 항-랫트 IgG(11035, Invitrogen)를 사용하여 제거하였다. 제조업체의 지침에 따라 랫트 항-마우스 PECAM1 항체(550274, BD Pharmingen)로 코팅된 Dynabeads 양 항-랫트 IgG(11035, Invitrogen)를 사용하여 내피 세포를 분류하였다. DMEM-0.1% BSA로 5회 세척한 후, 세포를 6웰 플레이트에 시딩하였다. 폐 및 간 EC는 송아지 태아 혈청, 사람 표피 성장 인자, 기본 섬유아세포 성장 인자, 인슐린 유사 성장 인자, 사람 혈관 내피 성장 인자-165, 아스코르브산, 베타 트랜스 레티노이드 및 하이드로코르티손으로 보완된 내피 세포 성장 배지 2 (C-22011, PromoCell)에서 2-3세대 동안 유지되었다 (C-39211, SupplementPack EC GM2, PromoCell).
- [0173] EC는 6-웰 플레이트에 시딩하고 90% 합류까지 성장하도록 허용되었다. 이어서 세포를 PBS로 세척하고 혈청을 6 시간 동안 고갈시켰다. 세포를 내피 세포 성장 배지 2 (C-22011, PromoCell)에서 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 5.0 또는 10.0mM에서 VAD044로 1시간 동안 처리한 후 VEGF-A(25ng.ml⁻¹)로 30분 동안 자극하였다. 세포를 차가운 PBS로 세척한 다음, 프로테아제 및 포스파타아제 저해제(PPC1010, Sigma-Aldrich)가 함유된 RIPA 완충액(50mM Tris-HCl pH 7.4, 150mM NaCl, 1mM 에틸렌 디아민 테트라-아세트산(EDTA), 1% Triton X-100, 0.1% 나트륨 도데실 설페이트(SDS), 0.5% 데옥시콜레이트)에 용해시켰다.
- [0174] 아데노바이러스 감염
- [0175] 폐 또는 간 EC를 Cre-재조합효소 (SL100707, SignaGen Laboratories)를 발현하는 아데노바이러스로 감염 다중도(moi) 500을 사용하여 6시간 동안 감염시키고, PBS로 세척한 다음, 사용 전에 내피 세포 성장 배지 2에서 12 내지 60분 동안 배양하였다.
- [0176] *면역형광법 염색*
- [0177] 눈을 실온에서 10분 동안 PBS 중의 4% 파라포름알데히드(PFA)로 고정하고, 망막을 해부하고, S 4℃에서 밤새 PBS 중의 4% PFA로 후고정한 다음 면역염색을 위해 처리하였다. 망막을 PBS, 1% BSA 및 0.5% Triton X-100 중 4℃에서 밤새 투과시키고, PBS로 세정하고, PBlec (PBS, pH 6.8, 1% Triton-X-100, 0.1mM CaCl₂, 0.1mM MgCl₂, 0.1mM MnCl₂)로 2회 세척하고, PBlec 중에서 4℃에서 밤새 비오틴화된 그리포니아 심플리시폴리아 (*Griffonia simplicifolia*) 렉틴 (이소렉틴 B4)(B-1205, Vector Laboratories, 1:50)에서 항온배양하였다. PBS에서 5회 세척한 후, 샘플을 스트렙타비딘(streptavidin) Cy-3 (PA43001, Sigma-Aldrich, 1:100)로 그리고 PBS, 0.5% BSA, 및 0.25% X-100에 희석된 FITC와 결합된 α -SMA (clone 1A4) (F3777, Sigma-Aldrich)로 4℃에서 2시간 동안 항온배양하였다. 세척 후, 평평한 전체-마운트(whole-mount) 망막을 DAKO 배지(S3023, Dako)에 장착하였다. 레이저 스캐닝 현미경 SP5 또는 SP8 (Leica)을 사용하여 전체 마운트 망막의 완전한 고해상도 3차원 렌더링을 획득하였다.
- [0178] 웨스턴 블롯 및 정량화
- [0179] 샘플을 10분 동안 비등시키고 단백질을 10% 아크릴아미드 겔 상에서 분리하고 니트로셀룰로오스 멤브레인으로 옮긴 후 5% BSA 또는 5% 분유/Tris-완충 염수/Tween 20으로 차단한 다음, 토끼 항-Phospho-Akt1 (Ser473)(44-621G, Invitrogen), 토끼 항-Akt1 (2938S, Cell Signaling), 토끼 항-PhosphoSmad1/5(Ser463/465)(9516S, Cell Signaling), 토끼 항-Smad1 (6944S, Cell Signaling), 마우스 항-Phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204)(E10)(9106S, Cell signaling), 토끼 p44/42 MAPK (Erk1/2)(9102S, Cell Signaling), 염소 항

-엔도글린(AF1097, R&D systems) 및 마우스 항- β -액틴(A5441, Sigma-Aldrich)과 같은 1차 항체와 함께 항은배양하였다. HRP 항-토끼 IgG 또는 HRP 항-마우스 IgG(각각 W4011 또는 W4021, Promega) 또는 HRP 항-염소 IgG(HAF017, R&D systems)를 사용하고 이어서 BIO-RAD ChemiDoc 이미저(imager)에서 스캔하여 검출하였다. 이미지는 선형 범위에서 캡처하였으며 ImageJ 소프트웨어는 단백질 및 단백질 인산화 수준을 측정하는 데 사용하였다. 모든 블롯에 대해 배경을 빼고 결과를 도면에 표시된 바와 같이 정규화하였다.

[0180] 신생아 마우스에서 VAD044의 약동학(PK) 프로파일

[0181] VAD044를 멸균 PBS에서 제형화하였으며, 이를 2.5mg/kg의 용량 농도 및 10 μ l/g의 용량 체적으로 P3 및 P5에서 신생아 마우스에 복강내(ip) 경로를 통해 투여하였다. 주사 후 24시간 및 48시간에 수집된 말기 혈액 샘플을, 혈장 준비를 위해 이소플루란 마취 하에 각 마우스로부터 수집하였다. 연구에서 시점당 4마리의 신생 마우스를 사용하였다. 혈장 준비를 위해 혈액을 EDTA 코팅 마이크로베트(Sartsted)에 수집하였다. 혈액을 2700xg에서 10분 동안 원심분리하고 대략 30 내지 40 μ l 혈장을 제거하여 폴리프로필렌 튜브에 분주하였다 (동물당 2개 분취량). 혈장 샘플은 생체분석 전까지 -80°C에서 보관하였다. 혈장 샘플에서 VAD044 화합물 수준은 LC-MS/MS에 의해 판정하였다. 24시간 및 48시간에서 VAD044 혈장 농도는 다음 공식을 사용하여 Cavg를 계산할 수 있게 한다: AUC_{inf}/ (48시간에 걸친 간격 수).

[0182] 사람 용량 모델링

[0183] MONOLIX (버전 2019R1)의 검증된 설치와 함께 비선형 혼합 효과 모델링 접근법을 사용하여 사람 용량 모델링 분석을 수행하였다. R(버전 3.5.3)을 사용하여 데이터 및 모델 출력의 사전 및 사후 처리 분석하였다. 모델 구축에 사용되는 마우스, 랫트 및 개 중에서 생성된 모든 PK 미가공 데이터가, 전체 분석에 포함된 동물의 수 및 샘플의 수의 개요를 제공하는 표 3에 요약되어 있다.

표 3

표 3 VAD044에 대한 이용 가능한 농도 관찰의 요약

데이터	N 마리 동물	N 개 샘플	분석에 포함된 N 개 샘플
마우스	15	90	90 (100%)
랫트	161	861	861 (100%)
개	38	448	448 (100%)
합계	214	1399	1399 (100%)

[0185] 사람 모델의 PK 매개변수는 청소율(clearance)의 상대 스케일링법(allometric scaling) 및 체중에 따른 체적 매개변수를 기반으로 판정하였다. 생체이용율 및 흡수율에 대해 가정을 해야 했다. 흡수율 kabs는, -0.25의 지수로 체중에 따른 상대 스케일링법을 사용하여 개에 대한 값으로부터 유도되었다. 상기 지수는 kabs, 1/회와 동일한 물리적 단위와 관련된 다른 매개변수에 대해 이전에 관찰되었다 (Dawson TH. Allometric relations and scaling laws for the cardiovascular system of mammals. Systems. 2014 Jun;2(2):168-85). 현재 분석에서의 데이터는 인간의 생체이용율 값을 알리는 것을 허용하지 않았다. 따라서, 합리적인 가정을 해야 했으며 사람의 50% 생체이용율은 적절하게 보수적인 추정치인 것으로 가정되었다.

[0186] 아래 논의된 바와 같이, 마우스 신생아의 혈장에서 2.5mg.kg⁻¹의 용량에서 LC/MS/MS 생체분석에 의해 측정된 VAD044 유리 염기의 혈액 노출은 48시간 투약 간격에 걸쳐 22.9ng/ml(또는 55.1nM)의 Cavg에 해당한다. PK 모델링에 기초하여, 이러한 노출은 20 내지 40mg(VAD044 유리 염기)의 단일 균일 용량 Q.D.로 사람에서 달성되는 것으로 예측된다. 이러한 투여량은 VAD044의 예상 생체이용율이 50 내지 75%인 70kg 사람 성인에 대해 계산된다.

[0187] 평가된 화합물

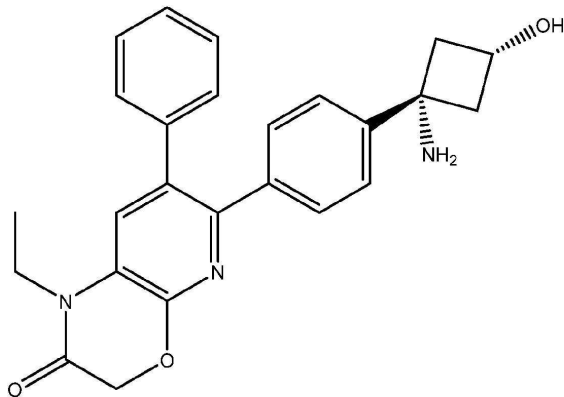
[0188] 상이한 AKT 키나아제 저해 특성을 갖는 3개 화합물을 시험하였다:

[0189] (i) **페리포신** (비교용 화합물): 알킬인지질 등급의 AKT 저해제. ATP 결합 키나아제 저해제와는 달리, 페리포신은 targets AKT의 플렉스트린 상동성 (PH) domain을 표적으로 하여, 원형질막으로의 이의 전위를 방지한다 (Gradziel et al., (2014), "Cytotoxic amphiphiles and phosphoinositides bind to two discrete sites on the Akt1 PH domain", Biochemistry, <https://doi.org/10.1021/bi401720v>; Kondapaka et al., (2003),

"Perifosine, a novel alkylphospholipid, inhibits protein kinase B activation", Molecular Cancer Therapeutics; Ros-Marco et al., (2017), "Alkylphospholipids: An update on molecular mechanisms and clinical relevance", In Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes, <https://doi.org/10.1016/j.bbmem.2017.02.016>)

[0190] (ii) **우프로셀립** (비교용 화합물): AKT1, AKT2 및 AKT3의 ATP 경쟁적 저해제. 이는 또한 PRKACA, PRKACB 뿐만 아니라 cGMP-의존성 단백질 키나아제 PRKG1 및 ROCK 키나아제를 포함하는 PKC 계열 구성원을 잠재적으로 저해할 수 있다 (Dumble et al., (2014), "Discovery of novel AKT inhibitors with enhanced anti-tumor effects in combination with the MEK inhibitor", PLoS ONE. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100880>)

[0191] (iii) **VAD044** (본 발명의 화합물): 다른 키나아제에 대한 뛰어난 선택성을 갖는 AKT1/2의 신규한 알로스테릭 저해제. 전술된 바와 같이, VAD044는 하기 화합물("VAD044 유리 염기"라고 한다)의 L-타르트레이트 염이다:



VAD044 유리 염기

IUPAC명: 6-(4-(1-아미노-3-하이드록시사이클로부틸)페닐)-1-에틸-7-페닐-1H-피리도[2,3-b][1,4]옥사진-2(3H)-온

[0192]

[0193] **페리포신 프로파일**

[0194] **독성**

[0195] P4에서 페리포신을 5 내지 25mg.kg⁻¹ 범위의 용량으로 1회 주사한 신생아 마우스에서 부작용이 관찰되지 않았다. 50mg.kg⁻¹의 페리포신 투여는 체중 증가를 지연시켰으며, 100mg.kg⁻¹의 페리포신 투여는 중요한 새끼 사망률을 유발하였다(도 3 참조). 따라서, 페리포신의 안전성 프로파일은, 신생아 마우스에서 이전에 시험되었고 HHT 환자에서 코피의 심각성과 빈도를 감소시키는 것으로 보고된 탈리도마이드(Thalidomide)와 같은 약물과 비교하면, 만족스럽다 (Lebrin et al., 상기와 같음).

[0196] **C57Bl/6J 마우스의 항혈관신생 특성**

[0197] P4에서 1회 투여된 저용량의 페리포신(5 내지 10mg.kg⁻¹ 범위의 용량)은 혈관신생에 영향을 끼치지 않았다(도 4a 내지 도 4d 참조). 25 내지 100mg.kg⁻¹ 범위의 고용량의 페리포신만이 망막 혈관 층의 작은 변화를 초래하였으며 분기점의 수와 혈관 영역의 수는 약간 감소하였다(도 4a 내지 도 4d 참조). 100mg.kg⁻¹의 페리포신은 또한 감소된 혈관 방사형 확장을 유도하여, 최소한의 내피 세포 항-이주 특성을 나타낸다(도 4a 내지 도 4b 참조). 결론적으로, 페리포신은 약한 항혈관신생 특성을 나타낸다.

[0198] **Eng-iKO 마우스에서 AVM 형성을 예측하는 능력**

[0199] 50μg 타목시펜을 P2 Eng-iKO 마우스에 주사하였다. 이어서 마우스에게 P3 및 P5에서(25 또는 50mg.kg⁻¹ 체중, ip)(도 5a) 또는 P3으로부터 P6까지 매일(10mg.kg⁻¹ 체중, ip) 페리포신을 복강내 투여하였다. 망막을 P7에서 분석하였다(도 5a). 비히클만을 또는 타목시펜과 비히클만을 주사한 한배새끼(littermate)를 대조군으로 사용하였다. 예상대로 P2에서 Eng의 조건부 결실은 망막 AVM 형성(도 5b) 및 약간의 감소된 혈관 파생물(도 3d)을 초래하였다. 페리포신은 Eng-iKO 마우스에서 AVM 형성을 방지할 수 없었고(도 5c) 시험된 용량 및 주입 방식에서

(도 5a 내지 도 5f) 혈관신생을 저해하지 않았다(도 5d 내지 도 5e). 더욱이, $25\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 의 페리포신을 매일 복강내 투여하면 새끼가 사망하였다(데이터는 표시되지 않음).

[0200] **우프로선틸 프로파일**

[0201] **독성**

[0202] 우프로선틸은, P4 내지 P7에서 관찰된 야생형 마우스의 새끼 생존력과 체중 및 이어지는 P4에서 우프로선틸의 단일 주사에 의해 입증된 바와 같이 매우 독성이 있는 것으로 밝혀졌다 (10 내지 $50\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 체중 범위의 농도) (도 6a 내지 도 6b). *Eng-iKO* 마우스에게 1 내지 $5\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 체중의 용량을 투여하면 대부분의 새끼가 사망하는 것으로 밝혀졌다.

[0203] *C57Bl/6J* 마우스의 항혈관신생 특성

[0204] P4에서 1회 투여된 저용량(5 내지 $25\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, ip)에서도 우프로선틸은 방사형 확장이 약간 감소하면서 혈관신생을 저해하였으며(도 7b); 혈관 영역의 현저한 감소(도 7c) 및 분기점의 수의 현저한 감소(도 7d)는 내피 세포 항증식 효과를 시사한다. 이러한 결과는 우프로선틸이 마우스 망막에서 혈관신생의 강력한 저해제임을 보여준다.

[0205] *Eng-iKO* 마우스에서 AVM 형성을 예측하는 능력

[0206] *Eng-iKO* 마우스는 P3 및 P5에서 우프로선틸을 2회 주사하였다(도 8a). 그러나, 우프로선틸을 2회 주사하면 대부분의 새끼가 사망하는 것으로 나타났으며(도 8b), 시험된 용량에서 마우스에서의 우프로선틸의 AVM 형성 방지 능력에 대한 추가 조사를 방지하였다.

[0207] **VAD044 프로파일**

[0208] 화합물 VAD044는 이미 종양 이중익식 모델의 이전의 전임상 연구에서 우수한 안전성 프로파일을 갖는 것으로 나타났다으므로, 추가의 안전성/독성 연구는 수행하지 않았다.

[0209] *Eng-iKO* 마우스에서 AVM 형성을 예측하는 능력

[0210] 시험된 농도는 우프로선틸에 대해 사용된 농도와 유사하였다(도 9a). 이러한 농도에서, 신생아 *Eng-iKO* 마우스에 VAD044를 P3 및 P5에서 1.25 내지 $10\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 체중 범위의 약물 농도로 2회 주사하는 경우 부작용이 관찰되지 않았다(도 9b). VAD044는 $2.5\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 이상의 농도에서 *Eng-iKO* 마우스에서 AV 선트 형성을 효율적으로 방지하였다(도 10a 내지 도 10b). $1.25\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 의 용량은 AV 선트 형성 방지에 효과적이지 않은 것으로 나타났다(도 10a 내지 도 10b). VAD044는 또한 혈관신생에 약간의 영향을 미치면서 *Eng-iKO* 마우스(도 10d)의 망막 혈관망 밀도를 정상화할 수 있었으며, 방사형 확장을 약간 감소시키고(도 10c) *Eng-iKO* 혈관망의 분기점 수를 약간 감소시켰다(도 10e). 마우스 신생아의 혈장에서 $2.5\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 의 용량으로 LC/MS/MS 생체분석에 의해 측정된 VAD044 유리 염기의 혈액 노출은 48시간 투약 간격에 걸쳐 22.9ng/ml (또는 55.1nM)의 C_{avg} 에 해당한다.

[0211] 1차 마우스 내피 세포에서 엔도글린 단백질 결실이 우선적으로 AKT 활성화를 유도함

[0212] 콜라게나제 I-기반 효소 분해를 사용하여 출생 후 7일(P7)에 *Engflox/flox* 새끼의 폐로부터 1차 내피 세포를 분리한 다음 PECAM1-코팅된 마이크로비드로 세포 분류를 수행하였다(도 11a). CD45-코팅된 마이크로비드를 사용하여 CD45+/PECAM1+ 면역 세포 집단을 고갈시켰다(도 11a). 분리된 CD45-/PECAM1+ 세포 집단은 내피 세포의 집단과 유사하였으며 적어도 3개 계대 동안 배양될 수 있었다. PECAM1 및 VE-카르헤딘(VE-cadherin) 염색은 내피 세포 정체성을 확인하였다(도 11b).

[0213] Cre-Lox 시스템을 활용하여, 1차 내피 세포 배양물을 Cre 재조합효소를 암호화하는 재조합 아테노바이러스로 감염시켜 *Eng* 유전자를 절제하였다. 아테노바이러스 감염은 매우 효율적이었고 세포 생존력에 영향을 끼치지 않았다. 거의 모든 세포가 최초 10시간 이내에 유전자 재조합되었으며, 엔도글린은 반감기가 약 17시간으로 추정되는 비교적 안정한 단백질이므로, 염색 및 웨스턴 블롯 분석에 의해 표시된 바와 같이 절반이 완전한 손실로 감소되는 범위인 엔도글린 수준에서 감염 후 최초 60시간 이내에 균질한 내피 세포 배양물이 얻어졌다(도 11c 내지 도 11d).

[0214] 이어서, *Eng* 단백질 발현이 고갈된 폐 내피 세포에서 Akt 및 Smad1 신호전달 경로의 활성화를 조사하였다. 세포

는 엔도글린 발현 수준에 따라 감염 후 서로 다른 시간에 30분 동안 VEGF, TGF- β 1 및 BMP9로 처리하였다. Jakobsson의 실험실에서 이전에 발표한 바와 같이 (Jin et al., 2017 - 상기와 같음), 엔도글린 단백질 발현 감소가 Akt 인산화 증가와 관련됨을 확인할 수 있었다(도 12a). 가장 흥미롭게도, AKT 인산화는 Eng 단백질 감소에 더 민감한데, 이는 Eng 단백질의 50% 감소가 정상 수준의 엔도글린을 발현하는 내피 세포에 비해 Akt 인산화의 증가를 유도하며(도 12a) 반면 Smad1 인산화는 변하지 않기 때문이다(도 12b). 이러한 결과는 엔도글린 발현이 절반으로 감소하면 VEGF 반응이 증가하고 AKT 신호가 증가하며 (증식 및 이동이 증가하고 혈관 기형에 기여함) 반면 고전적인 BMP/SMAD 신호전달은 정상으로 유지됨을 시사한다.

[0215] 대조군 및 Eng-iKO 마우스 내피 세포에서 VAD044 IC50 측정

[0216] 이어서 Eng-iKO 마우스로부터의 분리된 1차 폐 내피 세포에 대한 VAD044의 효과를 시험하였다. 예상한 바와 같이, Cre 아데노바이러스 감염은 60시간 후 엔도글린 발현의 완전한 손실을 초래하였다(도 13a). 정상 수준의 Eng 발현을 갖는 대조군으로부터의 EC는 55nM에서 측정된 IC50으로 VAD044에 매우 민감하며, 반면 Eng 발현의 완전한 손실을 나타내는 폐 마우스 내피 세포에서 VAD044의 IC50은 93nM이었다(도 13b). ~2배의 이러한 IC50 이동은 Eng 단백질이 완전히 녹다운되는 경우의 AKT 활성화(~2 내지 4배)의 증가로 설명될 수 있다(도 12a). 병행하여, p42/p44 인산화를 선택성에 대한 대조군으로서 분석하였으며, VAD044가 MAPK 경로에 영향을 끼치지 않는 것으로 확인되었다(도 13c).

[0217] 결과/논의

[0218] 우프로선티프는 AKT1, 2 및 3 이소형의 ATP 키나아제 결합 포켓에 결합하는 경쟁적 AKT 저해제이다. 상기 화합물은 강력한 pan ATP 키나아제 포켓 저해 기능이 있는 통상의 저분자량 스캐폴드이다 (Dumble et al., 2014). 그러나, AKT와 단백질 키나아제 A (PKA), 단백질 키나아제 C (PKC) 또는 단백질 키나아제 G (PKG) 사이의 ATP 결합 포켓에는 높은 수준의 상동성이 있다. 따라서 우프로선티프는 PKA, PKG, PKC 및 ROCK 키나아제에 대해 강력한 저해를 나타낸다. 이러한 "표적을 벗어난" 키나아제 활성화는 종종 부작용 증가와 관련된다 (Rodon et al., (2013), "Development of PI3K inhibitors: Lessons learned from early clinical trials", Nature Reviews Clinical Oncology, <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2013.10>).

[0219] 반면, 알로스테릭 저해제는 AKT에 대해 더 높은 특이성을 갖는 것으로 보인다. 예를 들면, VAD044는 신규한 AKT 알로스테릭 저해제이며, 이는 AKT1 및 2(*US9221838B2*)에 비해 강력한 효능을 갖는 이러한 계열의 저해제 중 가장 우수한 선택성 프로파일 중 하나를 제공한다. 페리포신은, AKT의 플렉스트린 상동성 도메인을 표적으로 하여 활성화에 필요한 원형질막으로의 전위를 방지하는 특이한 알로스테릭 저해제이다.

[0220] AKT 키나아제 저해에 대한 VAD044의 생화학적 및 세포 효능은 우프로선티프와 유사하다. 예를 들면, 우프로선티프 및 VAD044는 유사한 생화학적 키나아제 활성 분석을 기반으로 하여 AKT1에서 각각 180nM 및 125nM의 IC₅₀을 나타낸다 (Pachl, et al (2013). "Characterization of a chemical affinity probe targeting Akt kinases", Journal of Proteome Research, <https://doi.org/10.1021/pr400455j>; and Example 3 above re VAD044). 유사하게, 2개 분자는 Pi3K α 또는 PTEN 돌연변이 세포주(예를 들면 MCF7, BT474 또는 LnCAP)에서 AKT 키나아제 저해에 대해 유사한 IC₅₀ 범위를 나타내며, 우프로선티프의 경우 34 내지 143nM 그리고 VAD044의 경우 50 내지 130nM이다. 반면, 페리포신은 μ M 범위에 있는 유사한 세포주에서 AKT에 대한 세포 저해 활성을 갖는 VAD044 및 우프로선티프보다 약한 효능을 갖는다 (Gradziel et al., 2014; Kondapaka et al., 2003; Rios-Marco et al., 2017 - 상기와 같음).

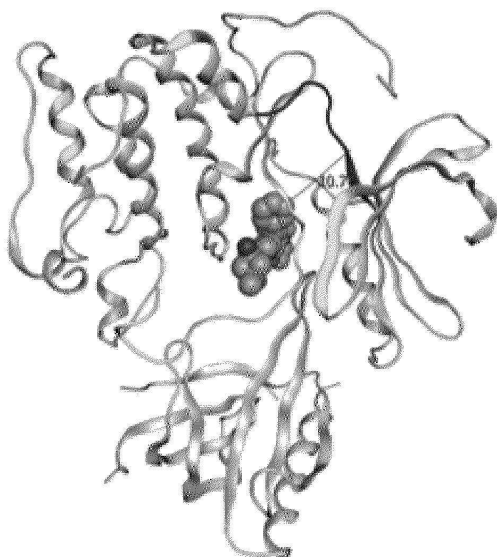
[0221] 상기 결과는 허용 가능한 안전성 및 바람직한 저해 효능을 모두 갖는 페리포신 및 우프로선티프에 대한 치료 용량 범주를 식별하는 것은 불가능하였음을 보여준다. 페리포신의 경우, AKT 키나아제의 완전한 저해가 예상되는 고용량에서도 정상적인 혈관신생 및 AVM 선트에 끼치는 영향은 미미하였다. 허용될 수 있는 최고 용량(25mg.kg⁻¹ 및 50mg.kg⁻¹)에서, HHT1 마우스 모델의 선트 형성에는 유의한 영향이 관찰되지 않았다. 10mg.kg⁻¹을 매일 주사하면 효능에 대한 경향성이 관찰되었지만 통계적 유의성은 달성되지 않았다. 반면, 우프로선티프는 P3에서 1회 주사시 강력한 항혈관신생 특성을 나타내었다. 5mg.kg⁻¹ 용량은 내약성이 우수하였으며 효능 연구를 위해 선택되었다. 그러나, P3 및 P6에서 2회 주사하면 5mg.kg⁻¹ 용량은 높은 수준의 새끼 사망률을 초래하여, AVM 선트 형성 방지 효능에 대한 추가 평가를 배제하였다. 이는 P3와 P7 사이에서의 새끼 발달에 관여할 수 있는 PKA, PKG 및 ROCK 키나아제에 대한 우프로선티프의 비표적 저해 효과 때문일 수 있다 (Shi et al., (2011), "Rho-kinase in development and heart failure: Insights from genetic models", Pediatric Cardiology.

<https://doi.org/10.1007/s00246-011-9920-0>.

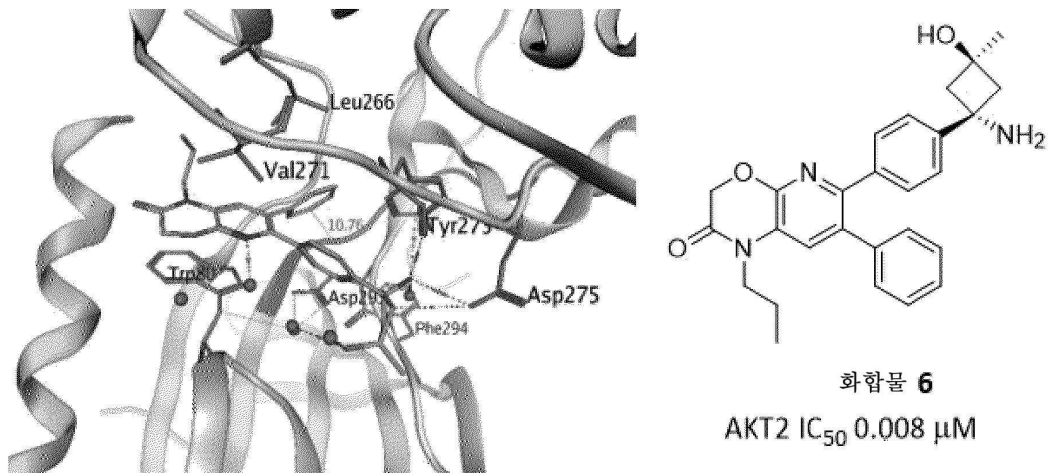
- [0222] 5mg.kg^{-1} 의 유사한 투여량에서 VAD044의 2회 주사는 관찰된 치사율 없이 내약성이 우수하였다. 2.5mg.kg^{-1} 에서 VAD044는 AVM 선트 형성을 완전히 방지할 수 있었다. 놀랍게도, 이러한 용량은 선트 형성을 방지하는 데 완전히 효과적이면서 정상적인 혈관신생에 거의 또는 전혀 영향을 끼치지 않는다.
- [0223] 이러한 결과는 VAD044가 AKT 경로 저해 메커니즘에 의해 HHT에서 관찰되는 혈관 결함을 치료할 수 있음을 시사한다. 또한 이는 부분 경로 저해가 HHT에서 관찰되는 혈관 결함을 치료하기에 충분할 수 있음을 시사한다. 우선, 상기 결과는 내피 세포에서 Eng 결실이 우선적으로 AKT 신호전달을 2 내지 4배 과활성화하며, 반면 SMAD 신호전달은 정상으로 유지됨을 확인한다. 상기 결과에서 확인된 2.5mg.kg^{-1} 의 최소 유효 용량은 22.9ng/ml (또는 55.1nM)의 VAD044 유리 염기 Cavg의 혈액 노출에 해당한다. 상기 농도는 낮으며 정상 내피 세포에서 AKT 저해에 대한 VAD044의 IC_{50} , 및 Eng 단백질이 결실된 내피 세포에서 AKT 저해에 대한 VAD044의 IC_{30-40} 에 해당한다. 놀랍게도, HHT 모델에서 VAD044의 최소 유효 용량은 중앙 적응증에서보다 훨씬 낮다. 시험관내 MCF7 중앙 세포에서 VAD044의 IC_{50} 은 유사하지만 ($\sim 50\text{nM}$), 중앙 이종이식 모델에서 생체내 최소 유효 용량은 30mg.kg^{-1} , 즉 상기 HHT1 마우스 모델보다 약 10배 더 높다. 다른 PK 모델링을 기반으로, 22.9mg/mL 의 Cavg에 해당하는 이러한 유효 농도는, 20 내지 40mg (VAD044 유리 염기)의 단일 균일 용량 Q.D.로 사람에서 달성될 것으로 예측된다. 이러한 투여량은 70kg 사람 성인에 대해 50 내지 75%의 VAD044의 예상 생체이용률로 계산된다.
- [0224] 전반적으로, 이러한 결과는 HHT 유전자 결실을 동반하는 맥관구조 및 내피 세포가 AKT 저해에 매우 민감함을 시사한다. 따라서, 저용량의 VAD044는 경로가 과활성화될 때 혈관 기형을 제어하는 데 효과적일 수 있으며, 이는 아마도 HHT에서 관찰되는 BMP9 신호전달의 억제로 인한 것일 수도 있지만 과성장 증후군 또는 체세포 돌연변이로 인한 정맥 기형에서 관찰되는 기능 돌연변이 PI3Kalpha 또는 TIE2의 획득 때문일 수도 있다 (Castillo et al., (2016), "Phosphoinositide 3-kinase: a new kid on the block in vascular anomalies", Journal of Pathology (Vol. 240, Issue 4, pp. 387-396). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/path.4802>).

도면

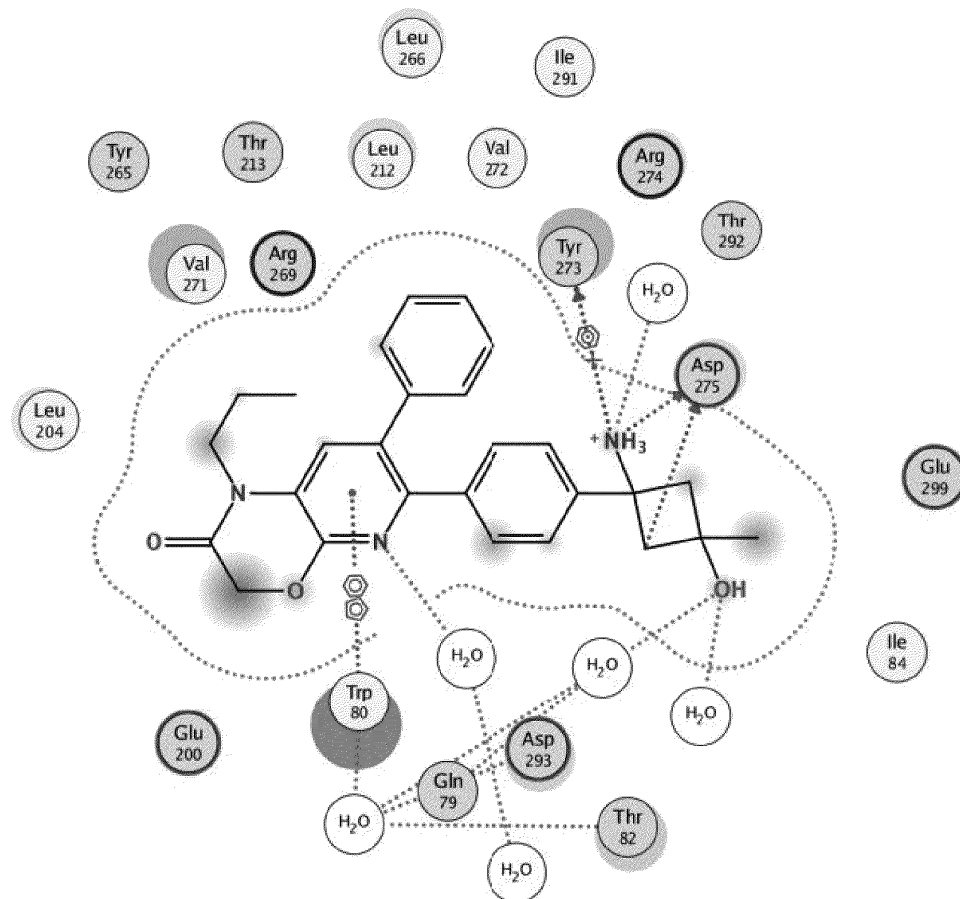
도면1a



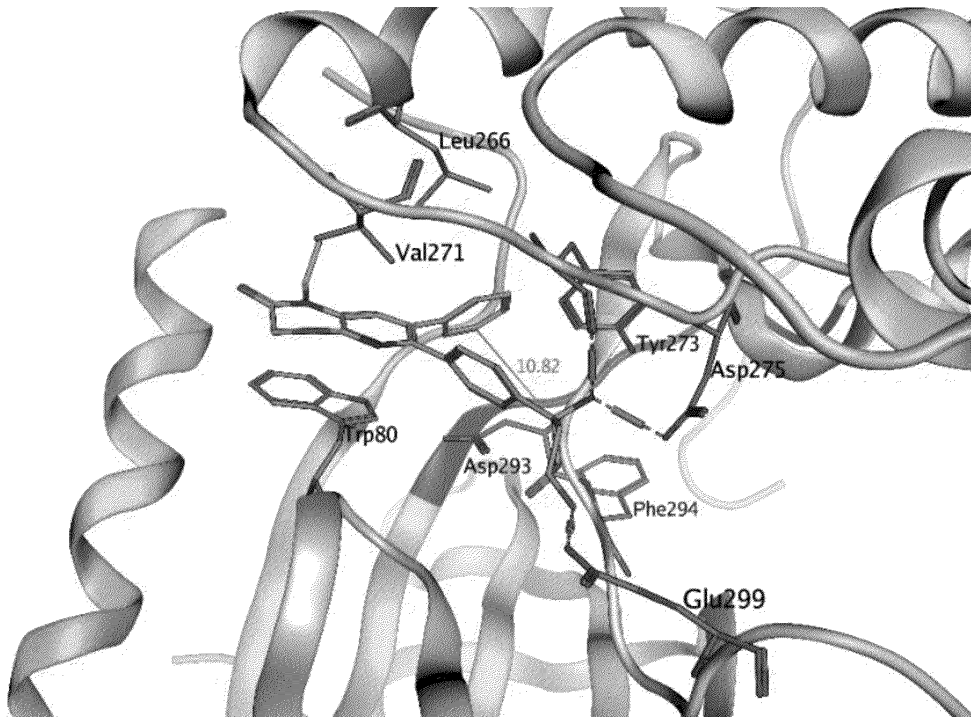
도면1b



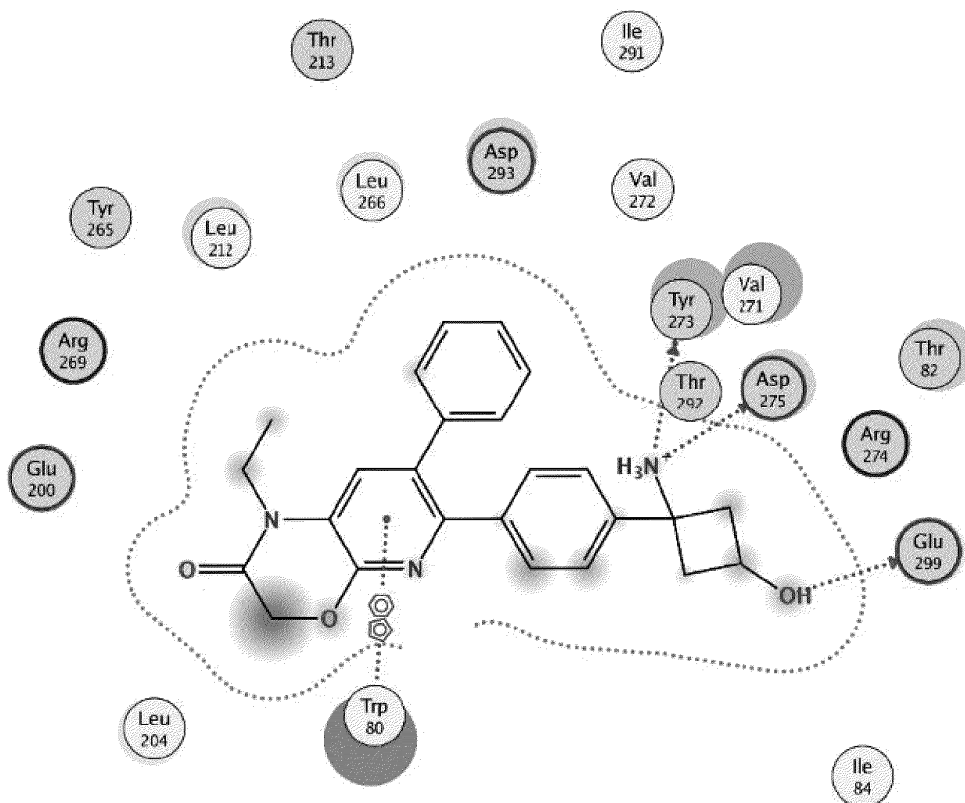
도면1c



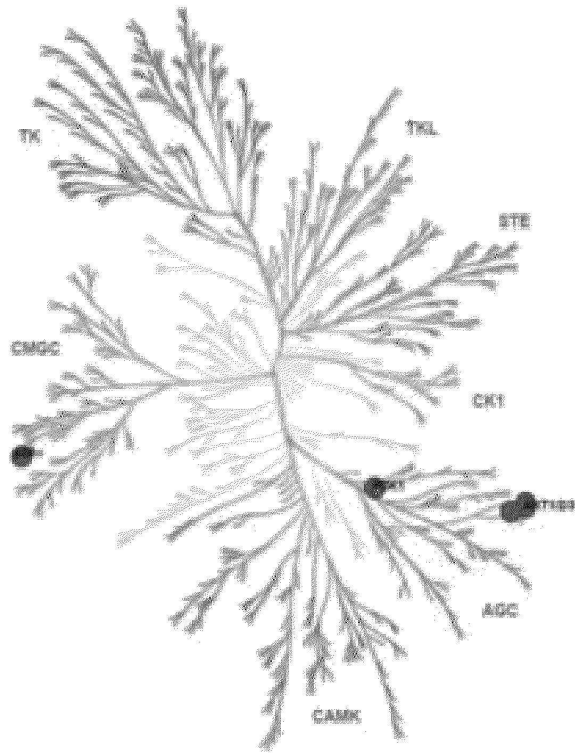
도면1d



도면1e



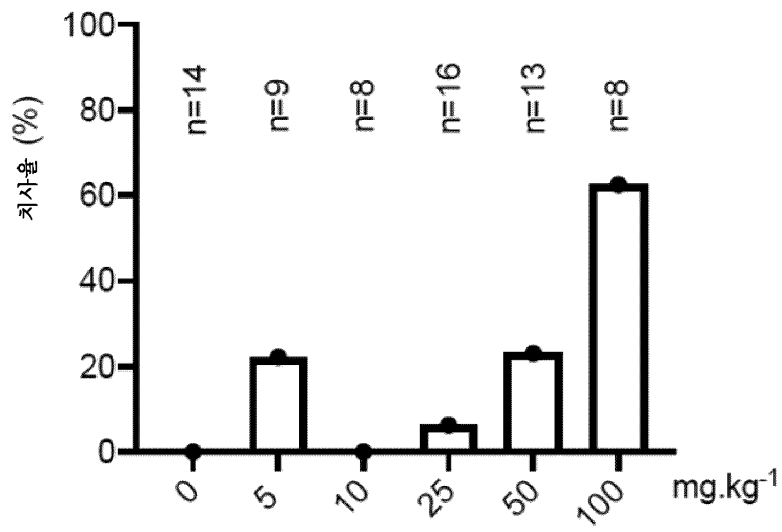
도면2a



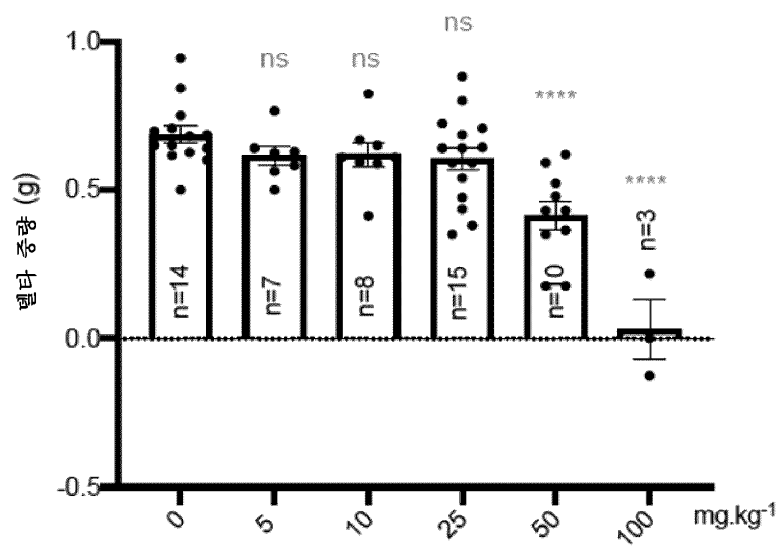
도면2b

키나아제	10 μ M에서의 저해율(%)
AKT2	95
AKT1	89
p38 α	84
PDK1	77
AKT3	72

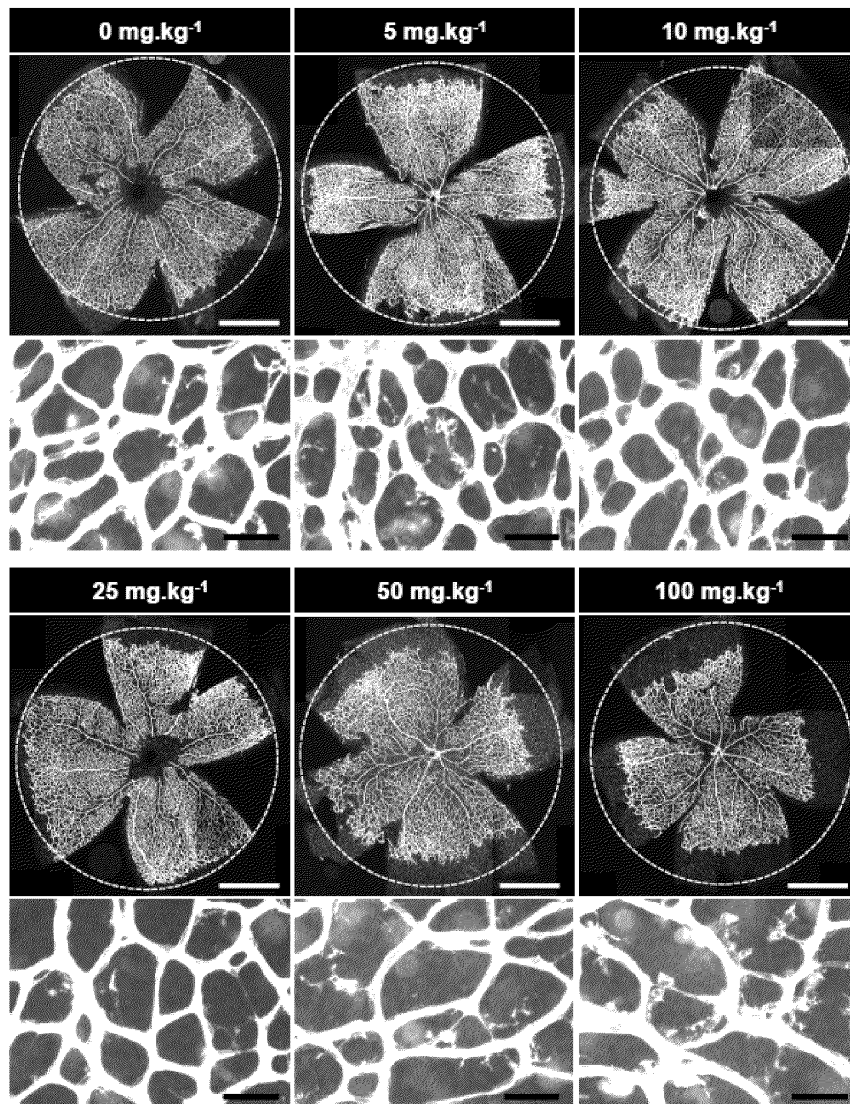
도면3a



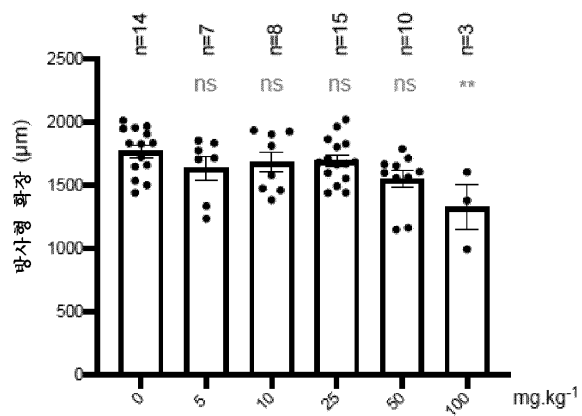
도면3b



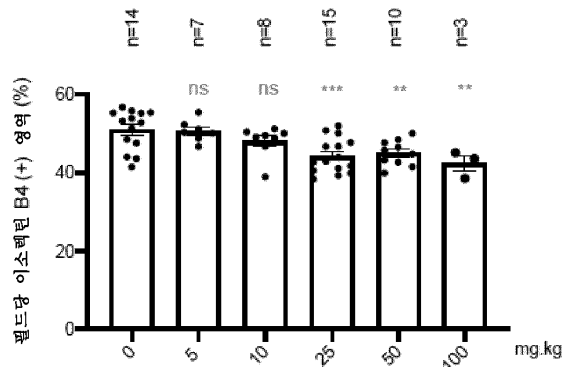
도면4a



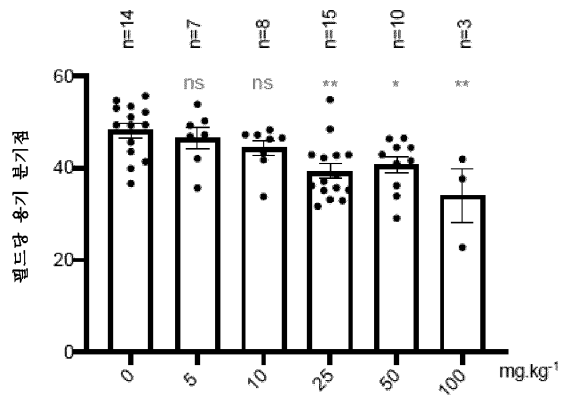
도면4b



도면4c



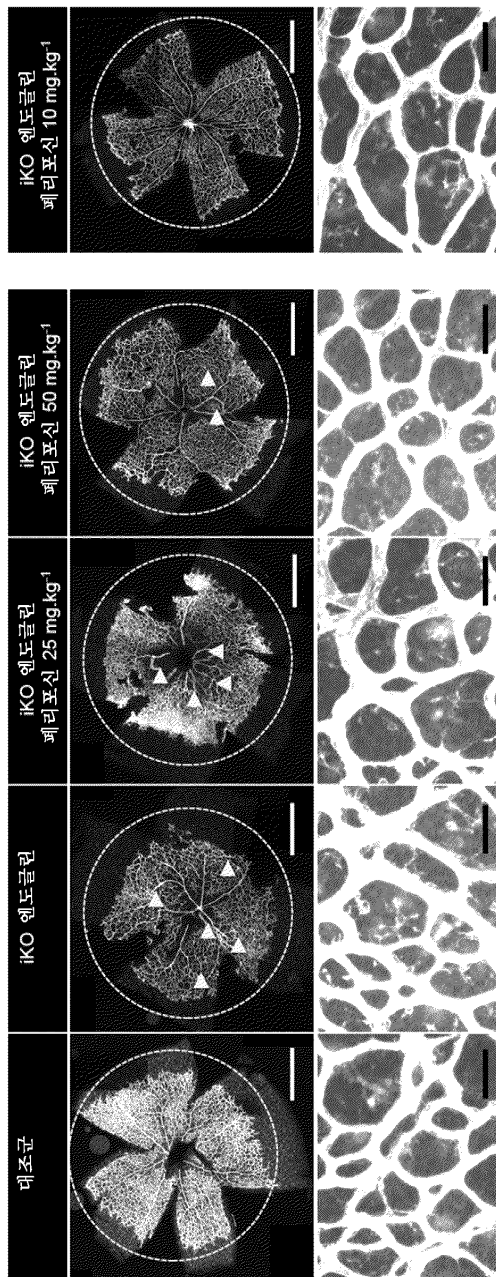
도면4d



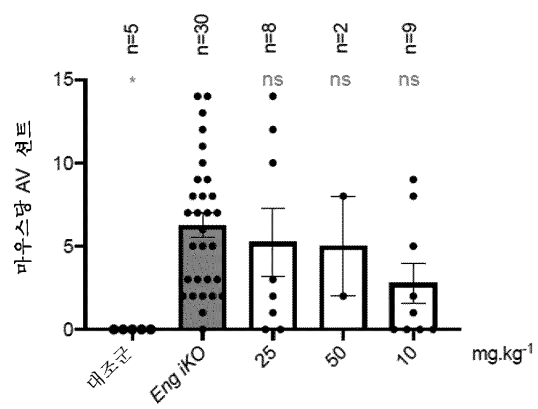
도면5a



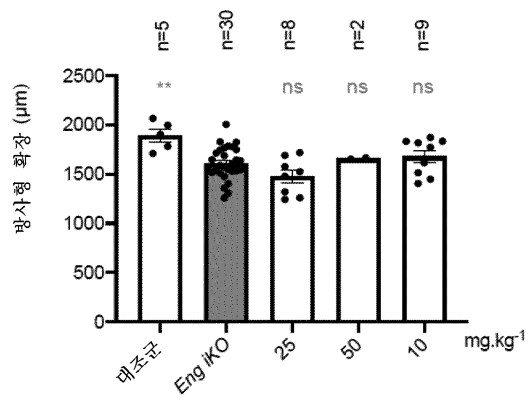
도면5b



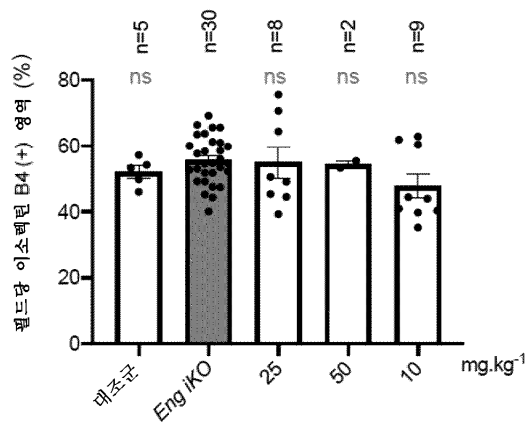
도면5c



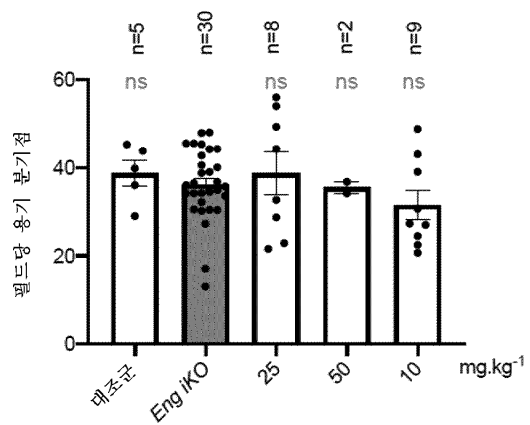
도면5d



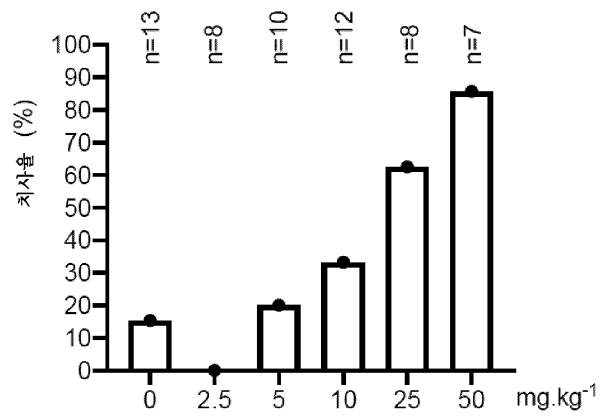
도면5e



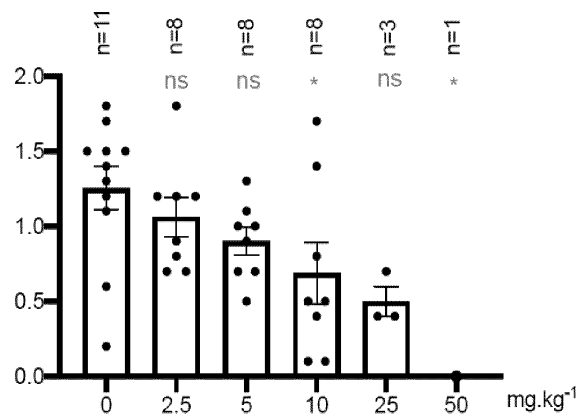
도면5f



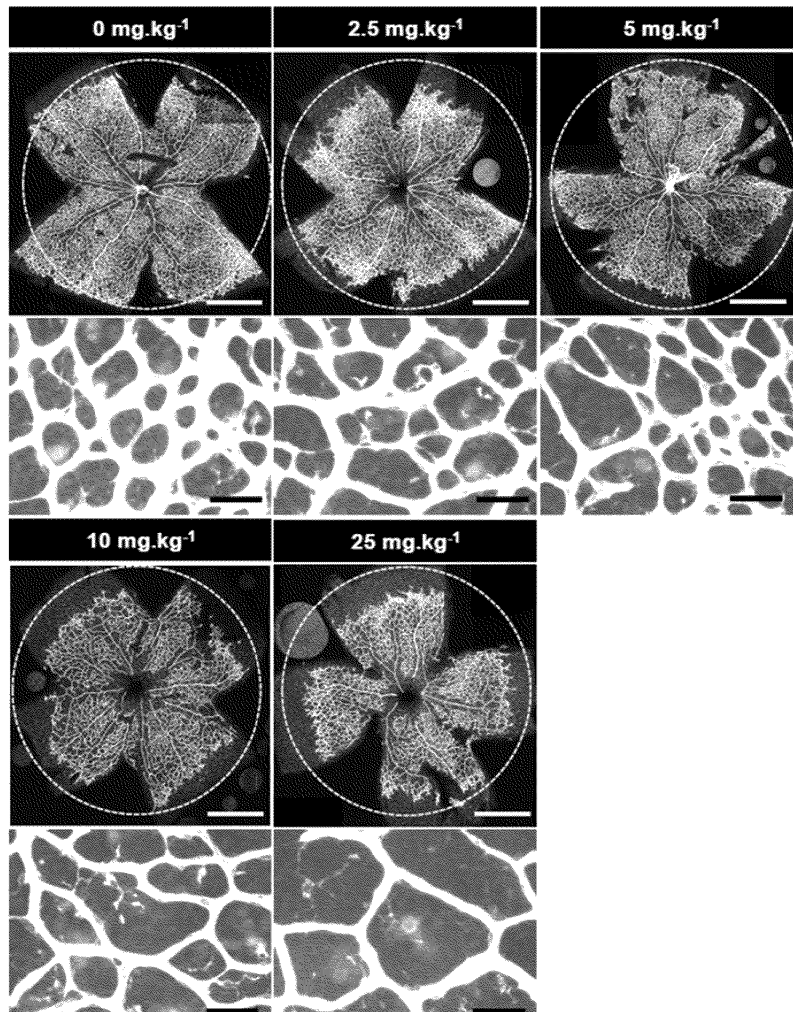
도면6a



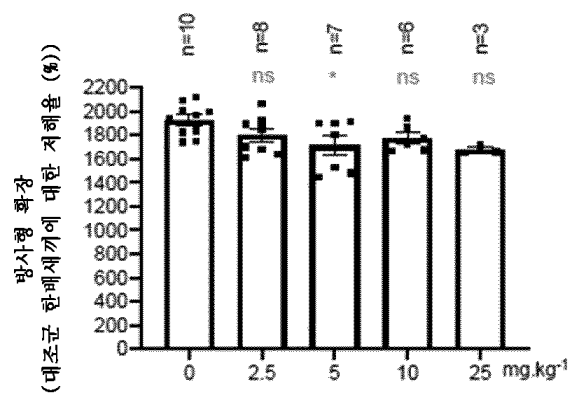
도면6b



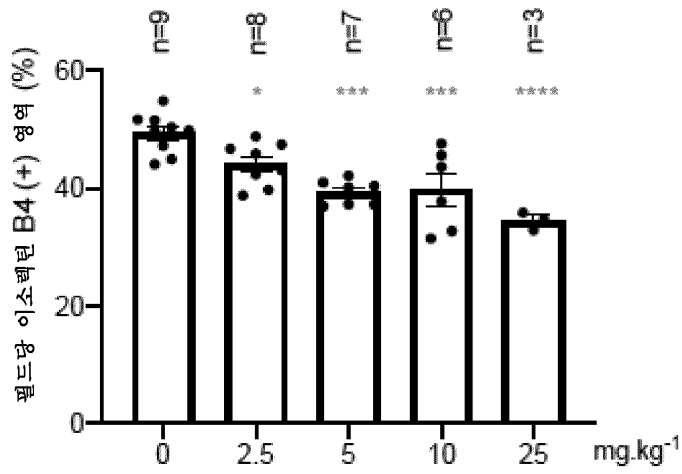
도면7a



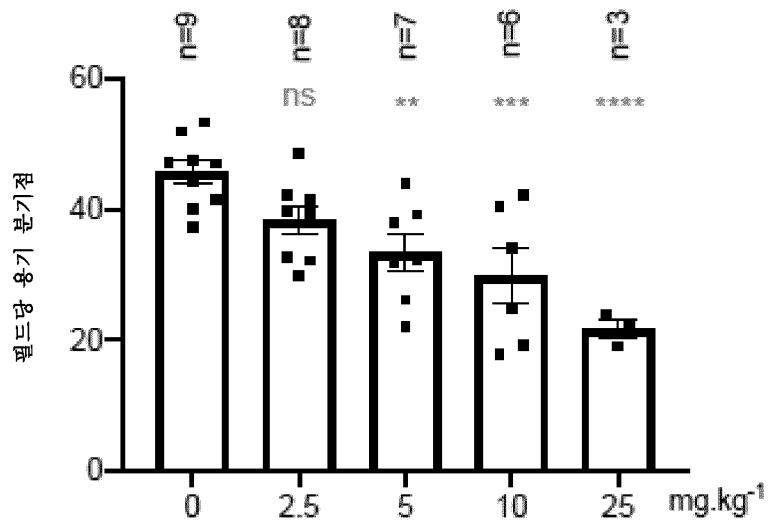
도면7b



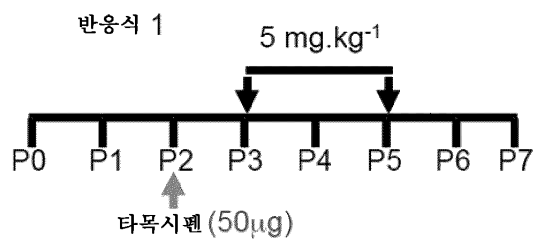
도면7c



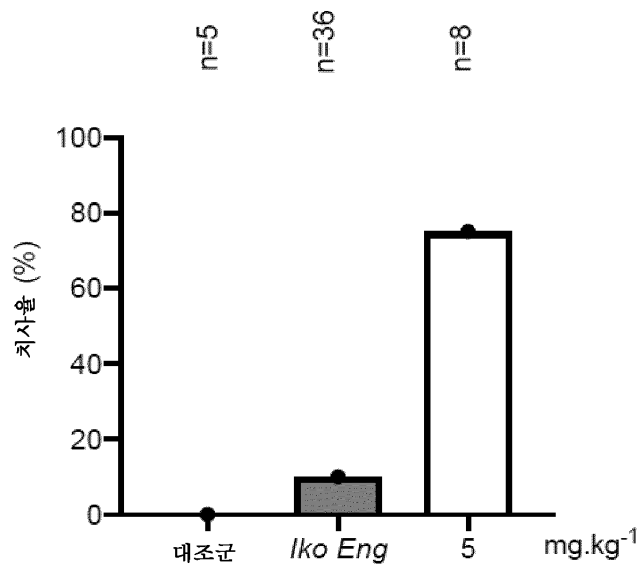
도면7d



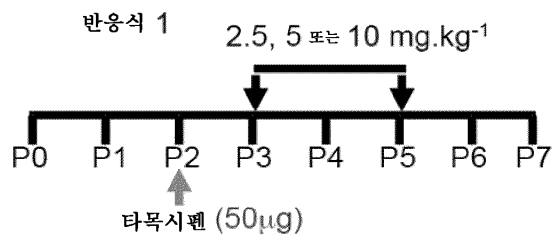
도면8a



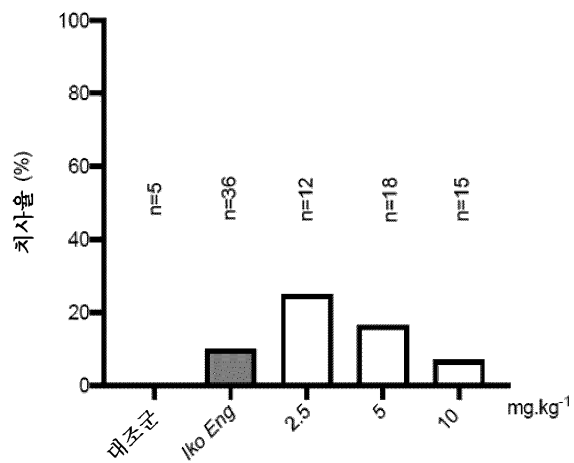
도면8b



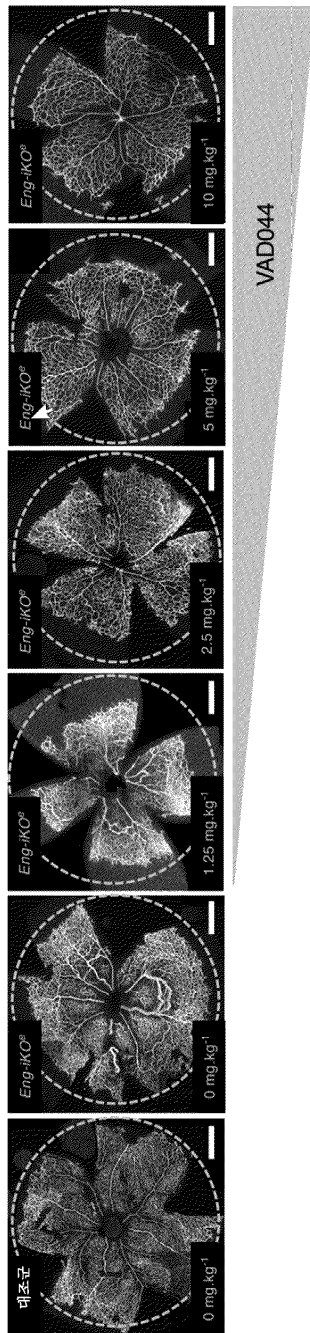
도면9a



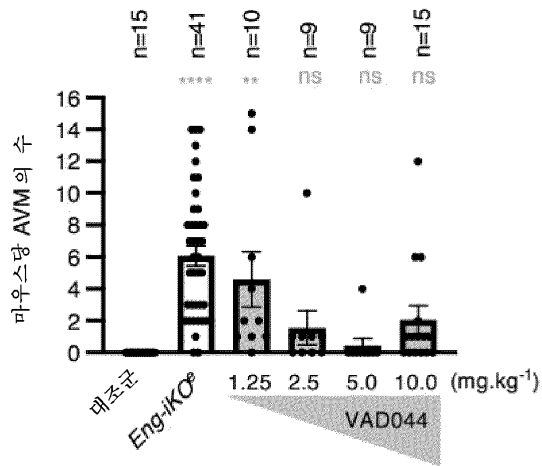
도면9b



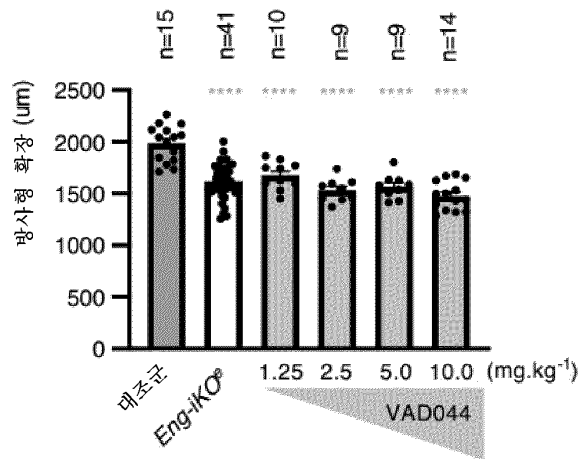
도면10a



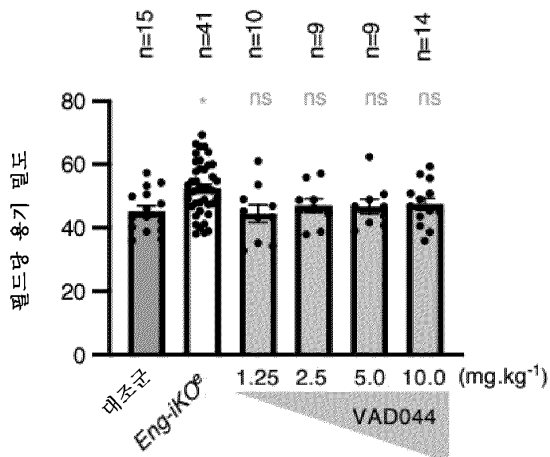
도면10b



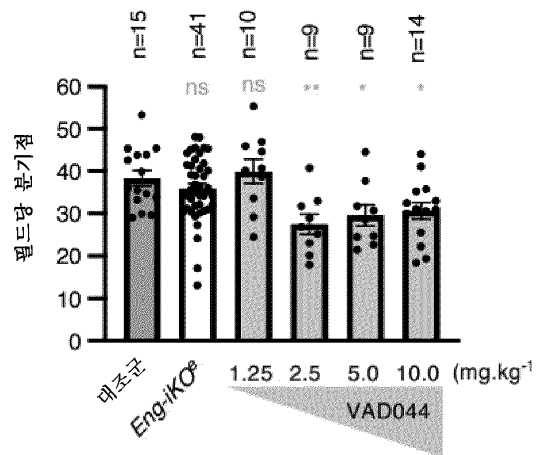
도면10c



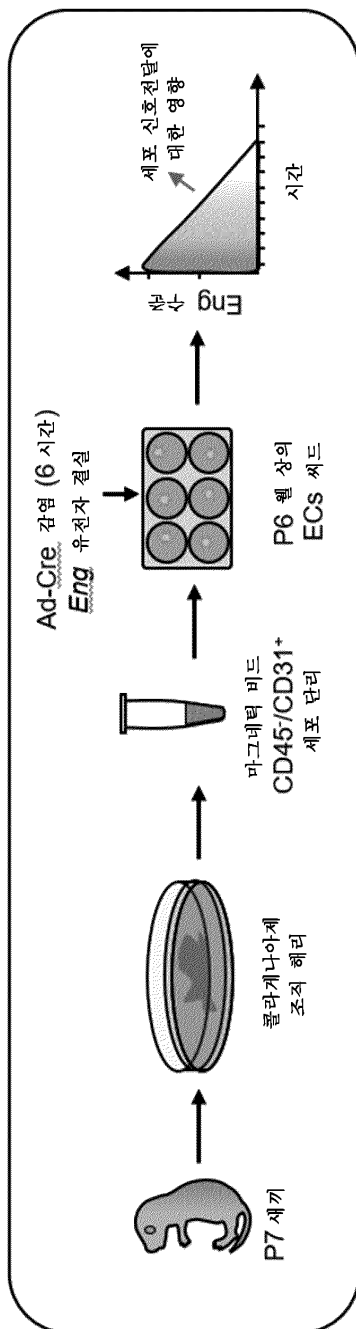
도면10d



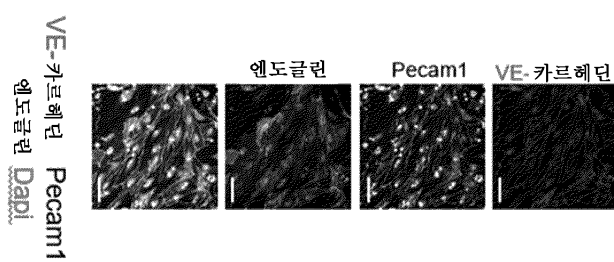
도면10e



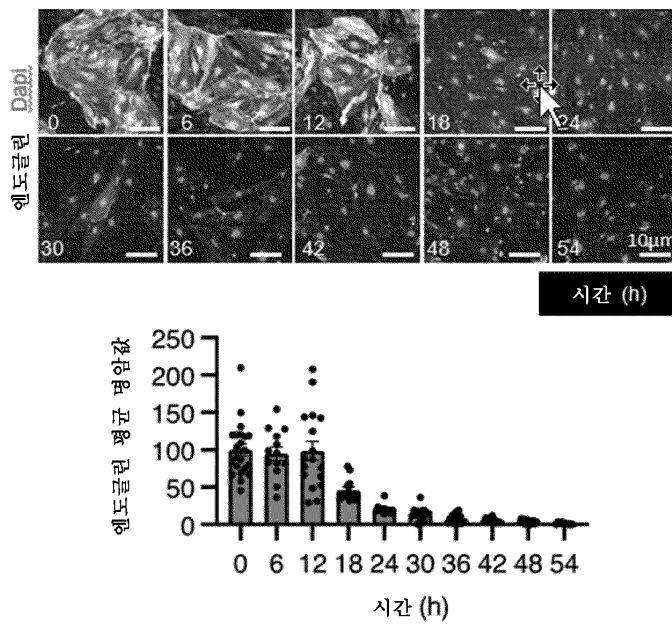
도면11a



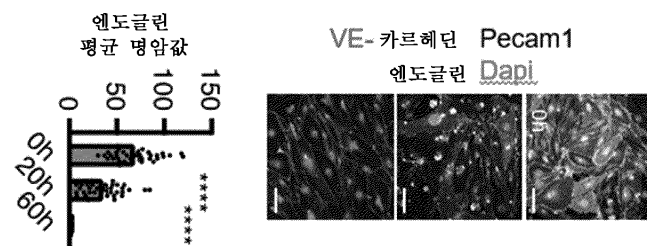
도면11b



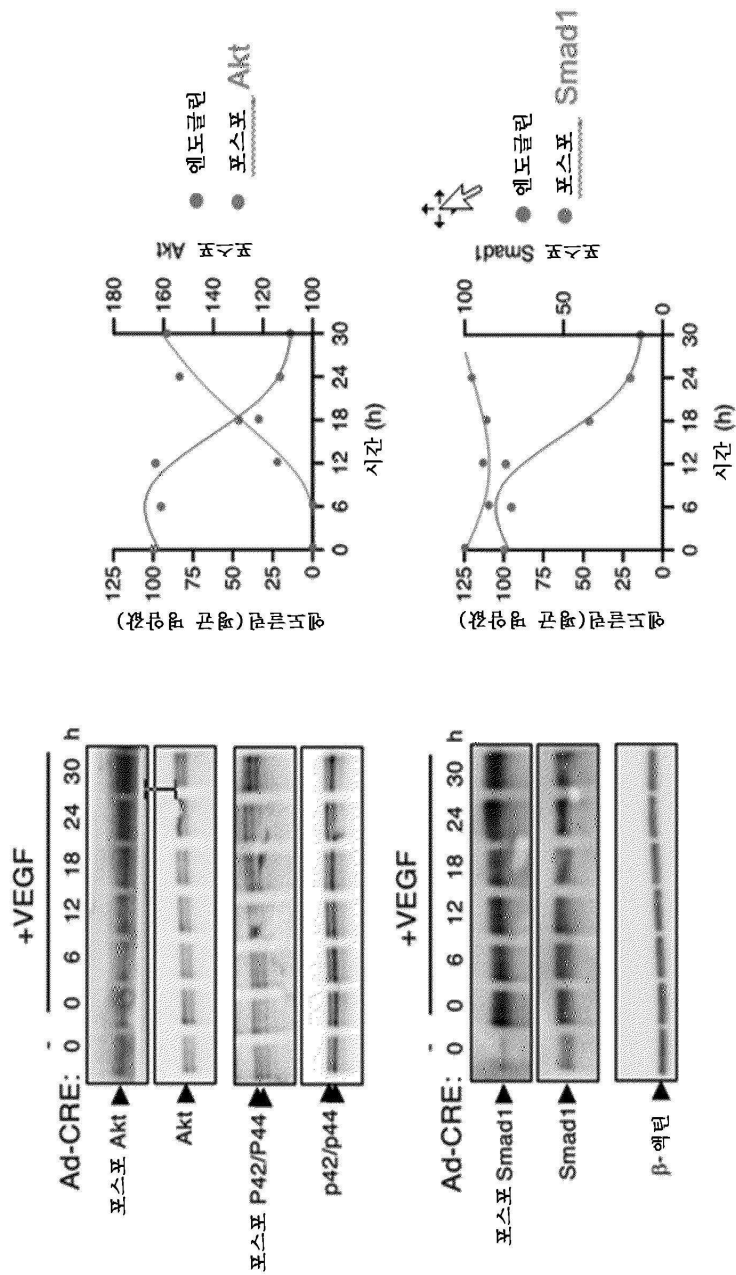
도면11c



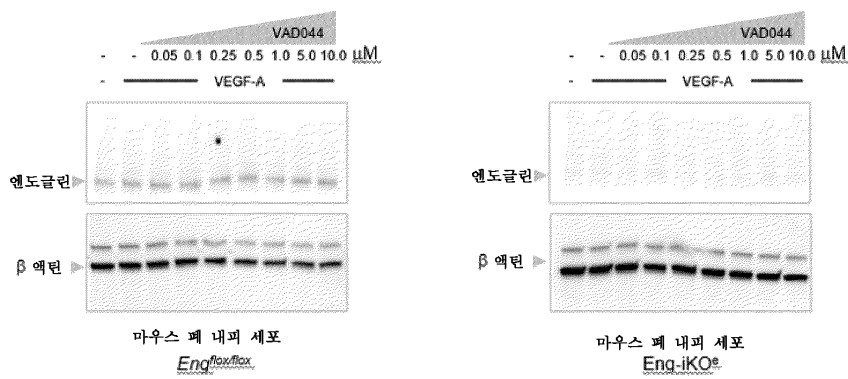
도면11d



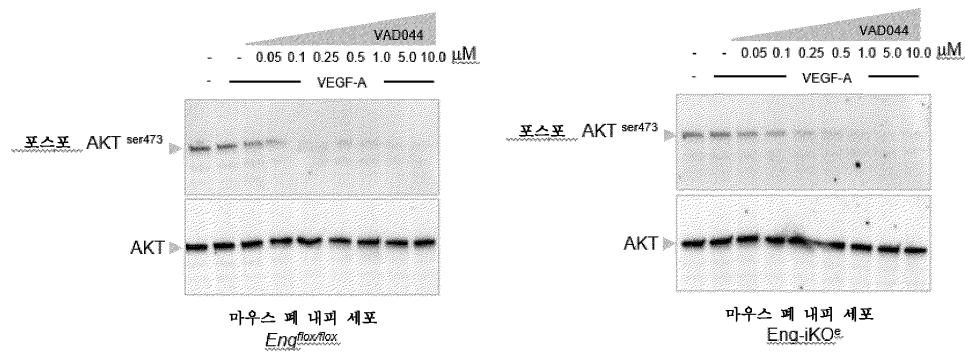
도면12



도면13a



도면13b



도면13c

